



TITLE:

タンパク質膜透過装置における
SecYとSecEの相互作用(
Dissertation_全文)

AUTHOR(S):

馬場, 理

CITATION:

馬場, 理. タンパク質膜透過装置におけるSecYとSecEの相互作用. 京都大学, 1994, 博士(理学)

ISSUE DATE:

1994-03-23

URL:

<https://doi.org/10.11501/3075807>

RIGHT:

許諾条件により本文は2011-04-01に公開

②

主論文

タンパク質膜透過装置におけるSecYとSecEの相互作用

京都大学理学研究科化学専攻

細胞生物化学分科

馬場 理

§ 要旨

SecYはタンパク質膜透過反応に重要な膜内在性のタンパク因子である。タンパク質の膜透過過程の中でも脂質二重層を実際に横断する過程を解析していくことは非常に重要である。膜透過の主要因子SecYとSecEは密接に相互作用しつつ機能することが、再構成実験や遺伝学的知見などから示唆されており、両者の相互作用は膜透過反応で中心的な位置を占めていると考えられる。本研究ではSecY-SecE相互作用の解析に焦点を当て、SecEとの相互作用に関わるSecY上の部位を遺伝学的手法を用いて同定することを目指した。

本研究の背景として以下のことがある。(a) SecY分子は単独では非常に不安定であるが、合成後速やかにリミティング因子SecEと安定な複合体を形成する。(b) 優性欠損変異 $secY^{d1}$ は、過剰発現により優性の分泌欠損をもたらすが、 $secY^{d1}$ による分泌阻害は $secE$ 過剰発現で抑制される。従って $secY^{d1}$ タンパク質は、SecEとの結合において野生型SecYと競合することにより、野生型複合体の形成を妨げると考えられる。

$secY^{d1}$ に加えてSecEとの相互作用を失わせる第2の変異が導入されると、二重変異遺伝子の産物はもはやSecEと複合体を形成することができず、野生型SecYのSecEとの活性複合体の形成を阻害することなく細胞の膜透過活性は回復するものと考えられる。このような変異を分離することによりSecY上の、SecEとの相互作用に関与する部位を同定することができる。そのような遺伝子内抑制変異を分離し、それらの位置を解析することによりSecEとの相互作用に重要なSecY部位を同定した。

まず、 $secY^{d1}$ を持つプラスミドに対してランダムなリンカー挿入変異を導入した。この時フレームシフト等により $secY^{d1}$ タンパク質自体が合成できなくなったノックアウト変異を除外するために、標的として $secY^{d1}$ -LacZ α 融合タンパク質を発現するプラスミドを作製して用いた。このプラスミドをDNaseIでシングルカットし、XhoIリンカー存在下で再環状化した後、寒天培地上のコロニーの色で分泌欠損の有無が判定できる株($secA$ - $lacZ$ 遺伝子融合株)に導入し、分泌欠損が起こっていないコロニーをプールした。変異プラスミドの混合物を $lacZ \omega$ を持つ株に導入し、プラスミド上のLacZ α 部分が発現したためLacZ ω との相補によるLacZ活性を示したもののみを選別した。この選別によってSecY領域の非特異的ノックアウト変異を除外した。

得られた変異プラスミドを保持する株でのSecY^{d1} α タンパク質の合成及び分泌阻害の有無を、パルスラベル実験によって確認した。変異位置を解析したところ、挿入/欠失を伴う変異がSecYの細胞質領域4（C4領域）に集中して得られた(図)。制限酵素AccIIでシングルカットを導入し、同様のスクリーニングを行ったところ、欠失を伴わない2アミノ酸挿入変異が同じくC4領域のみに得られた。またリンカー挿入変異がSecY^{d1} α を著しく不安定化したり、膜配向性を攪乱したりしないことを確認した。以上の様に、遺伝子内抑制変異がC4領域に集中して分離されたことから、C4領域がSecEとの相互作用に重要であることが示唆された。

次に同じC4領域のミスセンス点変異secY24（高温感受性の分泌欠損を現す）がSecY-SecE相互作用に及ぼす影響を検討した。secY24は上記の挿入/欠失変異と同様secY^{d1}による分泌阻害効果を抑制した。過剰生産し不安定なSecY、及びSecY24タンパク質の、SecEによる安定性の有無を調べた。その結果、野生型SecYとは対照的に、SecY24変異タンパク質がSecEの過剰生産によってほとんど安定化されないことが示された。また、染色体から発現される基底レベルのSecY24タンパク質は42℃で不安定化されることを見出した。この結果により、secY24変異がSecEとの相互作用に（特に高温）で影響を及ぼすことが強く示唆された。さらに、より直接的にSecY-SecE複合体を検出することによりsecY24変異がSecY-SecE複合体形成に及ぼす影響を検討した。野生株、及びsecY24変異株から膜を調製し、非イオン性界面活性剤で穏和に可溶化し、抗SecY抗体による免疫沈降を行った。野生株由来の膜可溶化物からは、SecYと共にSecEが共沈殿した。しかしsecY24変異株由来のものからは、SecY24変異タンパク質とSecEの共沈殿が観察されなかった。この結果は、secY24変異がSecY-SecE相互作用を弱めるものであることを示した。

以上の実験から、

1: secY^{d1}による優性分泌欠損を抑制する挿入/欠失変異はC4領域に集中すること

2: C4領域の変異であるsecY24によって、SecY-SecE相互作用が弱まる

ことが明らかになった。従って、

SecYのC4領域はSecY-SecE相互作用にとって重要な役割を持っていると結論する。

§ 目次

第1章：序論・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 1

第2章：本研究の背景・・・・・・・・・・・・ 1 1

第3章：結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 2 1

第4章：考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 4 1

第5章：材料と方法・・・・・・・・・・・・・・ 5 1

第6章：参考文献・・・・・・・・・・・・・・ 5 6

謝辞・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 5 9

§ 第1章：序論

1-1: タンパク質の局在性と膜透過

細胞膜は細胞内部を外界と区分し、自立的な代謝や自己複製の単位を定義する要素として重要である。膜は細胞内部をも仕切っていて、細胞内小器官（オルガネラ）などを形作るためにも重要である。膜は細胞活動の維持に必要な代謝や物質合成を実現する化学反応系を、狭い体積の中に限定することによって効率よく行わせる役割も果たしている。これらの化学反応は遺伝情報に基づいて合成されるタンパク質によって触媒される。膜に包み込ませることによって基質の拡散を防ぎ、触媒反応を効率よく進ませるわけである。

細胞における化学反応は、膜で仕切られたオルガネラ等の各コンパートメントや、細胞の外側でも行われる。従ってそれら化学反応の触媒であるタンパク質も、細胞質で合成された後、それぞれが機能する場所に「輸送」されなければならない。このことはタンパク質が膜構造を横切って移動する膜透過反応の必要性を意味している。しかし、主にリン脂質二重層からなる細胞膜の基本性質は種々の分子やイオンに対して、透過障壁として働くことである。最も小さなイオンである水素イオンも拡散によって膜を透過することは許されない。巨大分子であるタンパク質はどのようにして膜を通過するのであろうか。最近の研究はこの疑問に対する答えを見出しつつある。細胞はタンパク質の膜透過という大イベントを、タンパク質性因子の触媒によって成し遂げているということが明らかになってきつつある。次節ではその概要を述べる。

1-2: 真核生物における膜透過

1-2-1:小胞体への輸送

真核細胞では、細胞外、プラズマ膜、液胞やリソソームに輸送されるタンパク質はまず小胞体に輸送され、その後小胞輸送を介してゴルジ体を經由し運搬される。最終的な局在場所が各コンパートメント上の膜である場合は小胞体膜に組み込まれるが、液胞やリソソームの膜構造の内側に局在されるタンパク質や、細胞外に分泌されるタンパク質は小胞体内腔に移行する。小胞体内腔への輸送が細胞膜を横切る「膜透過反応」である。これにより各タンパク質のトポロジー（細胞質を基準とした膜との位相学的位置関係）が決定されている。真核細胞の場合、この膜透過は輸送されるタンパク質が合成される際、ポリペプチド鎖の伸長と共役して起こると考えられている。小胞体へ輸送されるタンパク質はそのアミノ末端側に「シグナル配列」と呼ばれる標識を伴って合成されることが多い^[1]。動物細胞を用いた研究では、ポリペプチド鎖の伸長に伴ってリボソームから露出してきたシグナル配列部分にSRP（シグナル認識粒子）^[2]が結合し、それによってポリペプチド鎖の伸長が一旦停止[3-5]、続いて小胞体膜上にあるSRP受容体^[6,7]にSRPが結合し^[8]、ふたたび小胞体内腔に向けてポリペプチド鎖の伸長が開始されることによって輸送が完了することが明らかにされた^[9,10]。一方酵母では、小胞体に存在してタンパク質の輸送を担う装置の同定という面からの研究が進んでいる。タンパク質輸送に関わる因子の温度感受性変異体が多数分離されているが、その中でSEC61、SEC62、SEC63^[11,12]、KAR2^[13,14]がタンパク質の小胞体膜透過に関わる必須因子として同定された。Sec61p、Sec62p、Sec63pは小胞体膜に組み込まれているタンパク質であり、膜透過反応を促進する一方、Kar2pは小胞体内腔に存在し、移入したタンパク質と一時的に相互作用して膜透過反応そのものをドライブしたり、折り畳みを制御することにより、正しい構造形成を促進するとそれぞれ考えられている。

1-2-2:ミトコンドリアでの膜透過

小胞体への膜透過に続いて起こる細胞外、プラズマ膜、液胞やリソソームへのタンパク質輸送という主要な経路の他に、核にコードされたミトコンドリアやペロキシソームタンパク質がこれらのオルガネラに取り込まれる反応もよく研究されている^[15,16]。後者の場合、輸送されるタンパク質は細胞質で合成された後に、小胞体を経ることなしに直接これらのオルガネラへと移行し、それぞれの膜を透過する。輸送されるタンパク質は、小胞体への輸送に必要なシグナル配列とは異なる、標的シグナルを伴って合成される。ミトコンドリア外膜の細胞質側表層には輸送されるタンパク質に特異的な受容体^[18-20]が存在し、この受容体から外膜-内膜に組み込まれた輸送装置複合体（GIP）^[17]に輸送されるタンパク質が受け渡された後ミトコンドリア内部へと移行すると考えられている。また、ミトコンドリア内部へ輸送されるタンパク質は、細胞質に存在する熱ショックタンパク質HSP70及びその同族体HSC70、いわゆる「分子シャペロン」によって高次構造形成を妨げられること^[21]、かつミトコンドリアのマトリックス部分にも存在するミトコンドリア型HSP70によって、膜透過に伴う高次構造形成が阻害されること、及び膜透過反応が促進されることが内部への輸送に重要であると考えられている^[22]。また、マトリックスHSP70との相互作用に引き続いて、別の熱ショックタンパク質であるHSP60と相互作用することが、輸送されたタンパク質の機能的な構造形成に必須であると考えられている^[23-25]。

1-3:原核生物における膜透過

真核細胞と異なり、原核生物は膜によって区分された細胞内コンパートメント構造を持たない。グラム陰性菌である大腸菌では、細胞質で合成されたタンパク質が

細胞質膜を横切ることが膜透過であり、その外側であるペリプラズム空間（細胞質膜と外膜の間隙にある領域）へ移行することを「分泌」と表現する。この膜透過は翻訳が終了した以降に起こることが多いと考えられている^[26-28]。

真核生物では、タンパク質の細胞外への移行の最初のステップは、小胞体の膜透過と内腔への移動である。その後の小胞輸送によって小胞体内腔の分泌タンパク質は細胞外へと移行するが、小胞内腔のトポロジーは細胞外と等価と考えられ、膜透過以後の輸送の段階ではもはや膜透過は必要とされない。小胞体内腔への移行は、大腸菌では細胞質膜における膜透過に相当する反応である。膜透過するタンパク質が、「シグナル配列」をアミノ末端側に伴った前駆体として合成されること、それが膜透過の際に特異的なプロテアーゼ（シグナル[リーダー]ペプチダーゼ）で切断を受ける機構^[30]は、大腸菌と真核生物の両方で非常に類似している。そればかりではなく、最近小胞体膜と大腸菌の細胞質膜には互いに相同な膜透過因子が見出されている。上述した酵母のSec61タンパク質の相同体が動物細胞でも見出されたが、これらは大腸菌の膜透過装置SecYとアミノ酸配列や膜トポロジーにおいて相同性がある^[31]。異種生物間での膜透過装置の類似性や、基質である分泌タンパク質の互換性は、タンパク質膜透過反応が細胞にとって極めて基本的かつ普遍的なものであることを示している。

1-4:膜透過反応機構解明に果たす大腸菌研究の意義

モデル細胞としての大腸菌の研究は生命現象の解明に大きな貢献を果たしてきた。簡便に遺伝学的手法を用いることができるため、細胞内イベントに関与する遺伝子とその産物を同定したり、それらの細胞内における作用機構や相互関係を追求するのに適している。大腸菌を用いたタンパク質輸送に関する研究も大きな成果があがっ

ているが^[32,33]、遺伝学的手法によるところが極めて大きい。さらに遺伝学的手法によって得られた、ある変異タンパク性因子を精製し、その影響を生化学的手法と組み合わせた解析を行うなどの研究も近年進歩が著しい。

上述のように、大腸菌と真核生物の膜透過機構には類似性があることが示唆されているが、大腸菌における研究結果は、大腸菌それ自体に留まらず、生命全体に普遍的に用いられている膜透過機構の理解に大きく寄与すると考えられる。

1-5:大腸菌における分泌装置の遺伝学的同定と機能解析

1-5-1:遺伝学的手法による大腸菌Sec因子の分離

1980年頃に遡る遺伝学的手法による研究によって、分泌に関連する因子が次々と同定され、Sec因子と呼ばれている（SecとはSecretion：分泌の略）。大腸菌Sec因子は以下の4つの方法によって分離・同定が行われた^[34-37]。

(a)分泌タンパク質と細胞質タンパク質である β -ガラクトシダーゼ(LacZ)の融合タンパク質の特異な性質を利用したもの。分泌が正常な細胞では上記融合タンパク質は分泌経路に入るが、LacZ部分のが強固な立体構造により分泌経路途上で「目詰まり」を起こす。LacZ（ラクトースの代謝に必須である）機能には細胞質で4量体となることが必要であるが、分泌経路上で目詰まりを起こしているLacZは正しい4量体構造をとれず、ラクトースが利用できない。ここで、ラクトースが利用できるようになったものを分離することによって分泌装置に障害がある株を同定できる。この方法で*secA*、*secB*、*secD*^[34,35,38]が分離された。

(b)温度感受性変異株のコレクションから直接、分泌能の低下しているものを分泌タンパク質前駆体の蓄積を指標にスクリーンする方法^[36,39,40]。前述のリーダーペプチダーゼの活性中心はペリプラズム側にあり、シグナルの切断は膜透過を起こしたタンパク質のみに起こる。切断されていない分子が蓄積する細胞は分泌機能が欠損してい

る可能性が高い。分泌装置は細胞増殖に必須なためその変異は条件致死を示すことが多い。この方法で*secY*が分離された^[39]。

(c)*secA-LacZ*法（後述）：細胞内に分泌障害が生じた際分泌因子SecAの発現が上昇することを利用し、SecAのアミノ末端部分のカルボキシル側に β -ガラクトシダーゼ(LacZ)を融合させたタンパク質の発現上昇をLacZ活性の上昇で検出し、変異株のスクリーニング、選択に利用する^[37,41,42]。この方法で*secE*変異株が分離され^[37]、また*secY*、*secD*変異も得られた^[37,43]。

(d)分泌タンパク質のシグナル変異を抑制する変異(*prl*: Protein localization)を分離することによっても分泌装置の変異が得られた。野生型では分泌されないシグナル配列部分に変異を持ったタンパク質が、シグナル認識に関与すると考えられる分泌装置側の変異により分泌されるようになるというアイデアである。この方法により*prlA*、*prlD*、*prlG*変異が分離された^[44-47]が、これらはそれぞれ*secY*、*secA*そして*secE*遺伝子の変異である。

1-5-2:Sec因子の機能

以上のような手法で得られたSec因子は遺伝学的・生化学的手法をもってその機能の解析が進められ、その結果「分泌」というイベントがどのようなステップで進行するかが明らかになりつつある。まず、現在までに判明している各Sec因子の機能を挙げておきたい。

1-5-2-1: SecB

大腸菌の分泌タンパク質前駆体は、高等真核細胞の場合とは異なり（前述）、翻訳終了後に膜透過が起こると考えられている^[26-29]。この際、細胞質で翻訳・合成された分泌タンパク質前駆体は強固な立体構造を保持していないことが重要である^[48]

。SecBは、分泌タンパク質前駆体の高次構造形成を妨げ、分泌可能な状態を保持する役割を果たす、いわゆる『分子シャペロン』である^[49-52]。また、SecBには分泌タンパク質をSecAにターゲットする役割も持つことが示唆されている^[53]。

1-5-2-2: SecA

SecAは、膜の細胞質側表面に結合して2量体を形成して機能していると考えられている^[54,55]。SecAは細胞質にも一部見出され、これがSecA自体の発現を自己制御していると考えられている^[56,57]。SecAは、*in vitro*実験系において、SecBとOmpAタンパク質前駆体の複合体と結合することが示唆されており^[53]、また分泌途上の前駆体の成熟体部分もSecAとクロスリンクされる^[58]。SecAはそのアミノ末端側にATPase活性部位を持つ^[59,60]。分泌タンパク質の膜への挿入に必須であるこのATPase活性はTranslocation ATPase活性と呼ばれる^[61]。SecAはまた、後述する膜内在性因子SecYとも深く相互作用していると考えられている。SecAのATPase活性は、機能を持つSecY/SecEの存在によって活性化される^[62]。SecAは分泌タンパク質を細胞質から膜へと受け渡す役割を果たしており、ATPase活性と共役して前駆体を膜に挿入する働きをしており、この際SecA自身も膜に一部が挿入されるらしい^[63]。

1-5-2-3: SecY

SecYは細胞質膜を10回貫通する膜組み込み型タンパク質であり、両末端を細胞質側に配向し、6つの細胞質領域、5つのペリプラズム領域を持つ^[64]。酵母のSec61タンパク質はSecYの相同体であり、小胞体へのタンパク質輸送に関与する因子である。また最近高等真核生物の小胞体膜にもSec61の相同体が見出されたことから、膜透過反応には生物種を問わずSecY様の因子が必須のものであり、SecYが膜透過反応に中心的な役割を果たしていることが示唆される（前述）。当研究室では分泌欠損の*secY*変異株を分離し解析することにより、*secY*が分泌において重要であることを

見出した。その後、後に述べる高温感受性 $secY24$ 変異株^[65,88]、低温感受性 $secY$ 変異株^[42,67]、そして優性欠損 $secY$ 変異株 ($secY^d1$) ^[66]など多くの $secY$ 変異が分離され、 $SecY$ の構造と機能に関しての情報を提供しつつある。 $SecY$ は再構成法を用いた*in vitro* 実験で膜透過に必須な因子であることが示された^[68-70]。また、Jolyらは分泌途上の前駆体が $SecA$ だけでなく $SecY$ ともクロスリンクされることを示したが^[58]、これは $SecY$ が分泌タンパク質の前駆体と非常に近傍で機能していることを示唆している。

今回の私の研究に関連が深い優性分泌欠損 $secY$ 変異、 $SecY$ と $SecE$ の相互作用に関する知見は後に詳述する。

1-5-2-4: $SecE$

$SecE$ は膜を3回貫通する膜組み込み型タンパク質である。*in vivo*で増殖と分泌に必須であり^[71]、また膜透過反応の再構成にも必要である^[70]。 $secY$ および $secE$ にはいずれも prl 抑制変異が分離されているが、これはこれらの因子が前駆体のシグナル配列部分を介して、基質である分泌タンパク質と相互作用をしていることを示唆している。

1-5-2-5: $SecD$ 、 $SecF$

$SecD$ および $SecF$ はペリプラズム側に大きな領域を持ち、いずれも6つの膜貫通領域を持つ膜組み込み型タンパク質である^[72,73]。 $SecD$ 、 $SecF$ は大きなペリプラズム領域を持つこと、また prl 変異が分離されていないことから膜とは反応のより後期のステップに関与すると考えられていた。Matsuyamaらは大腸菌のスフェロプラストに対して抗 $SecD$ 抗体を作用させると分泌タンパク質の放出が阻害され、シグナルペプチドが切断された中間体が膜中に蓄積されることを観察し、 $SecD$ の機能について分泌タンパク質のペリプラズムへの放出に関与すると考察している^[74]。

1-5-3:大腸菌におけるタンパク質分泌のステップ

以上のSec因子の同定・解析によって、大腸菌におけるタンパク質分泌が複数のステップに分かれて起こること、各ステップにおいて関与するSec因子とその役割が明らかになってきた。その概要を示すが、以下のように大別されると考えられている。

(1) まず合成された分泌タンパク質前駆体はシャペロン分子によって高次構造の形成が阻害された形で膜表層へと移行し(2)膜装置によってシグナル配列が認識され、シグナル部分及び成熟体のアミノ末端部分の膜への挿入が開始される。

(3) 次に膜に組み込まれた膜透過装置により分泌タンパク質の大部分が膜を横断する。これに前後してシグナル配列が、リーダーペプチダーゼによって切断を受ける。(4) 分泌タンパク質の膜の横断が完了、膜からペリプラズム側への遊離が起こり、その後最終的な局在場所(ペリプラズム、外膜、細胞外)へと移行する。この模式図を図1-1に示す。

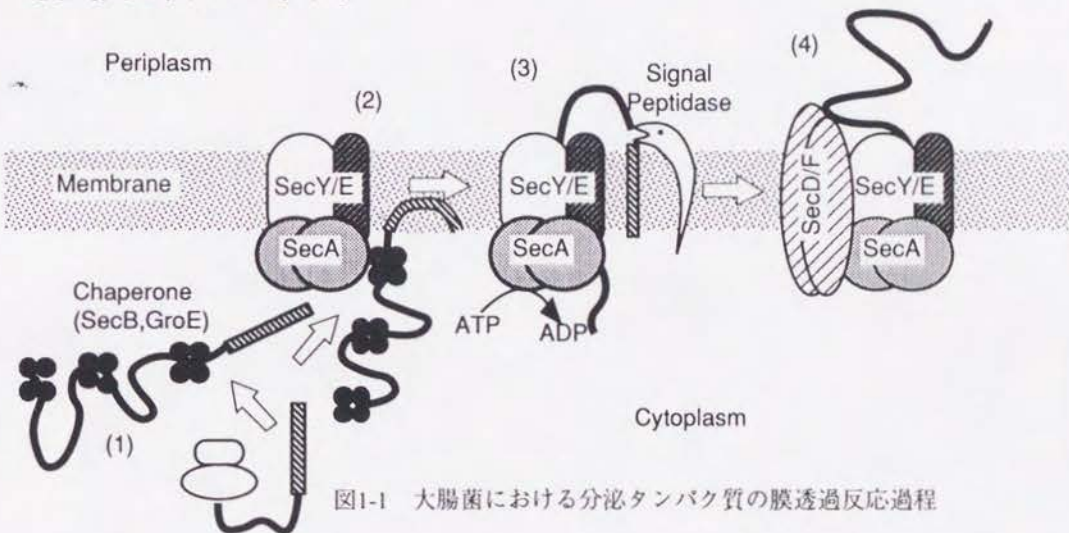


図1-1 大腸菌における分泌タンパク質の膜透過反応過程

次章の冒頭では、タンパク質分泌の中でも中心的なステップである上記(2)～(4)、すなわち膜透過反応解析の意義を示した上で、このステップで膜透過反応に重要な役割を果たしていると考えられるSecYとSecEとの相互作用に注目し、SecEとの相互作用に重要なSecY上の部位の探求という、本研究の中心テーマを導き出す

に至る過程について、その背景になった知見を中心に解説する。

§ 第2章：本研究の背景

2-1: SecY-SecE相互作用のについての知見

前章では遺伝学的方法によって分離されたSec因子の解析がタンパク質の分泌過程の複数のステップへの区分を可能にし、併せて各ステップで関与するSec因子の役割を考察してきたが、タンパク質の分泌過程全体の理解を深めるためには、膜透過の中でも脂質二重層を実際に横断する過程を解析していくことは非常に重要である。特にSecYとSecEは膜透過反応で中心的役割を担っていることが再構成実験により示されている。SecYとSecEの両者は密接に相互作用しつつ機能していると考えられる。

2-1-1: SecY-SecE相互作用；生化学的知見

後に詳述するが、SecYは単独では細胞内で非常に不安定であり^[43,75]、SecEと複合体を形成することにより、はじめて安定に存在できる^[43,76]。SecEによるSecYの安定化を最初に見出し、SecYの精製に利用する道を拓いたのはMatsuyamaらであり、プラスミド上からSecEとSecYを同時に過剰発現させ、これらのタンパク質を細胞内に大量蓄積させることに成功した^[76]。彼らのグループは、このような細胞の膜からSecYとSecEを1-O-n-オクチル- β -グルコピラノシド等の非イオン性界面活性剤によって穏和に可溶化し精製した後、リポソームに再構成するという実験系を用いて、SecY、SecEの膜透過反応に果たす機能を解析した。AkimaruらはSecAに依存した膜透過活性の発現にはSecYとSecEの両者が必要であることを示した^[70]。彼らの用いた実験ではSecYとSecEは別個に過剰生産株より精製されたものの、野生株細胞の膜を出発材料としたBrandageらの実験では、SecY-SecE複合体が活性成分として精製

された。Brandageらは可溶化した細胞膜のタンパク質をイオン交換カラム等で分画し、各分画をリボソームに再構成してATP及びSecA存在下で膜透過活性を調べたところ、活性のあるリボソームを与える分画にはSecY、SecE及びBandIタンパク質のみが存在することを観察した^[69]。さらに、クロマトグラフィーでこれらが挙動を共にする以外に、可溶化した膜を用いて抗SecY抗体によって抗体沈殿を行うと、SecE、BandIがSecYと共に沈殿することを確認した^[77]。これらの研究によりSecYとSecEが膜透過反応に重要な因子であること、両者が物理的に相互作用していることが明らかとなった。

2-1-2:SecY-SecE相互作用；遺伝学的知見

また遺伝学的研究によってもSecY、SecEの相互作用が示唆されている。Biekerらは、*secE*あるいは*secY*に起きた*prl*変異(*prlG*あるいは*prlA*)を*prl*⁺と部分二倍体として組み合わせ、そこでシグナル配列に変異を持つ融合タンパク質(変異シグナルを持つLamBタンパク質とLacZタンパク質の融合体)を発現させると、融合タンパク質は*prlG*または*prlA*変異で変化した分泌装置のみに認識されてLacZ部分が分泌経路上で目詰まり(SDI: suppressor Directed Inactivation)を起こすことを想定した解析を行った^[78]。*prlG(secE)*におけるSDIでは融合タンパク質のシグナル切断が起こらず、*prlA(secY)*におけるSDIではシグナル切断が起こり、膜透過がより進行した膜横断状態となっていると予想された。また、野生型*secY*存在下での*prlA*でのSDIで、SecEの発現量が低下する変異と組み合わせることによって増殖が阻害された。この増殖阻害は、SecYを含む複合体にはSecEが含まれているため、SDIによって野生型SecY-SecE複合体の形成が不十分となる(Sec titration)からであると解釈された。このような結果から、膜透過反応において分泌タンパク質前駆体はまずSecEと作用し、続いてSecEがSecYと相互作用しSecY-SecE複合体となり、その後膜透過が終了すると速

やかにSecYとSecEは解離するとのモデルを提唱している。このモデルは、SecYとSecEの複合体が恒常的なものではなく、解離結合を繰り返していることを意味する。しかしこの仮説に対して、SecYとSecEは合成後直ちに安定な複合体を形成するとの異論がある (Joly、Taura、後述)。

Osborneらは、*priG1*変異 (SecEのTM3領域の変異) と、特定の*priA* 変異の組み合わせが致死性をもたらすことを見出した^[79]。そのような*priA*変異はTM10領域に起こっていた。このことから彼らは、SecYのTM10領域がSecEのTM3領域と相互作用するとの説を提唱している。しかしこの説を支持する生化学的な実験結果は現在までのところ提出されていない。

当研究室でなされた優性欠損変異*secY^{d1}*の研究も、SecYとSecEの相互作用の重要性を示す遺伝学的知見であるが、これについては後に詳述する。

2-2: SecYの細胞内における存在状態へのSecEの関与、及び優性欠損*secY*変異

上述したようにSecYとSecEとの相互作用の重要性が種々の見地から示されているが、それらが細胞内でどのような機構で相互作用しつつ膜透過反応に参画するかについては未解決な点が多い。これに関してより詳細な研究を行うことは、膜透過反応の全体像解明に貢献すると思われる。筆者は本研究で、SecY-SecE相互作用の解析に焦点を当て、SecEとの相互作用に関わるSecY上の部位を同定することを目指した。以下は本研究の背景となった、SecEがSecYを安定化しその量を定めるリミティング因子であることを解説し、次に優性欠損変異*SecY^{d1}*タンパク質が野生型SecYと競合してSecEを奪うとの当研究室のモデルに基づいて、SecYにおけるSecEとの相互作用部位を同定する方法について述べる。

2-2-1: SecYの細胞内での存在状態

2-2-1-1: SecEはSecYの量を決定するリミテイング因子である。

当研究室のTauraらは以下のような実験により、SecYの細胞内での存在状態（安定性）についてパルス＝チェイス実験等により詳しく調べた^[43]。野生株細胞のSecYは安定であるが、多コピープラスミド上の*secY*遺伝子から過剰に発現され、新規に合成されたSecYタンパク質の大部分は細胞内で速やかに（半減期約2分）分解される。この分解は2相的に起こり、野生株における発現量に相当する部分は分解を受けずに安定に保持されるが、SecEの同時過剰生産によって過剰発現したSecYの分解がほとんど起こらなくなる。SecEの翻訳開始領域の変異*secE501*により、SecEの発現量が約50%に減少する*secE501*変異株中においては、染色体から発現するSecYもその約50%は合成後速やかに分解され、残りの50%は安定に保たれる。SecEと複合体を形成できなかった遊離SecYは非常に不安定で、合成直後に速やかに分解されると考えることができる。安定なSecYの量がSecE量の減少に呼応して減少することは、SecYの細胞内での安定な存在に関してSecEがリミテイングファクターであることを示している。

またこの結果は、正常細胞においてはSecYが合成直後にSecEと安定な複合体を形成し、一旦形成された複合体は安定であるということも示唆している。SecYとSecEが常に解離結合を繰り返しているならば、SecEが定常的に不足した*secE501*細胞中ではSecYの安定性についてもランダム化（明確な相に分離できない）しても良いように思われる。しかし、SecYの分解が極端な2相性を示すことは、そのような解離結合が起こっていないとすることに、より整合性が高い。すなわち、新規に合成されたSecYのみがSecEとの結合に参加し得る。Dr. W. Wicknerからの私信によれば、Jolyらはこのことをより直接的に示した。彼らはインフルエンザウイルスのヘマグルチニンタンパク質の抗原決定配列を付加したSecEまたはSecYを誘導できる系を用い、パルス＝チェイス実験によって、既に存在するSecY-SecE複合体と新たに合成

されたSecYまたはSecEとが混合することはないことを示している（未発表）。Joly、Tauraの結果は、Biekerらのモデル（前述）が妥当なものではないことを強く示唆している。

2-2-1-2: SecY分子は互いに競合してSecEと複合体を形成する

前節で述べたTauraらの結果は、SecY分子が互いに競合して、リミティング因子SecEと安定な複合体を形成することを示唆している。私はこのことを以下のように β -ガラクトシダーゼ α 配列（LacZ α ）を付加したSecYの挙動を観察することによってより明確に示した^[43]。

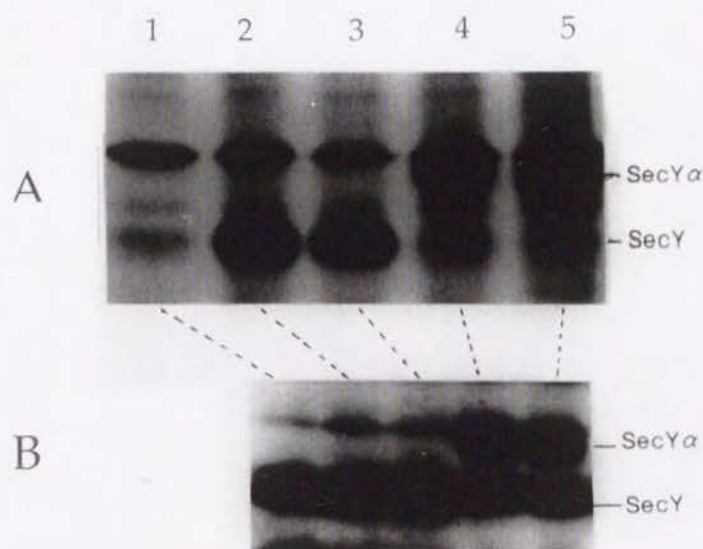


図2-1 SecY及びSecY α 過剰生産時における細胞内蓄積量 (A)プラスミドpKY238(ベクター；レーン1)、pKY248(secY⁺；レーン2)、pKY247(secY^{d1}；レーン3)、pKY258(secY⁺ α ；レーン4)、pKY259(secY^{d1} α ；レーン5)をそれぞれ保持するKI437株を37℃で生育させた後、^[35]Sメチオニンを用いて30秒間パルスラベルした。TCA処理して全タンパク質を沈殿させた後、再度SDSにより可溶化し、SecYに対する抗体を用いて抗体沈殿を行った。SDS-PAGEによる分離後オートラジオグラフィーで可視化した。(B)SecY及びSecY α の蓄積量観察。(A)における各サンプル（ただし非標識のもの）をSDSにより可溶化したものをSDS-PAGEによる分離後、ナイロンメンブレンに電気泳動的に転写した。次にSecY抗体をナイロンメンブレン上のSecY及びSecY α に作用させた後西洋ワサビペルオキシダーゼで標識した抗ウサギIgGで処理した。メンブレンをペルオキシダーゼの発光基質を含む溶液中に浸した後X線フィルム上でSecY及びSecY α バンドを検出した。

SecY配列のカルボキシル末端にin frameにLacZ α を付加した融合タンパク質SecY- α を発現するプラスミドpKY258を構築した。SecY α はsecY変異を相補するので活性を持つことがわかる（データ省略）。従ってLacZ α 配列の付加はSecY機能に影響を及ぼさない。上記プラスミドを大腸菌株に導入しその合成量をパルスラベル実験で調べると、染色体レベルのSecY発現量(図2-1A、レーン1)と比較して約10倍程度過剰に合成される(図2-1A、レーン4)。なおSecY α はSecY⁺よりも63アミノ酸長い分子として合成されるため電気泳動的にSecYと区別可能である。この合成量の上昇はSecY (プラスミドpKY248から供給) を過剰生産したもの(図2-1A、レーン5)と同程度である。しかし、細胞内における蓄積量を免疫プロットング実験によって調べると、SecY蓄積量は過剰生産をした場合(図2-1B、レーン2~5)でも、過剰生産をしない場合(図2-1B、レーン1)と比較して合成速度に見合うような増加が見られない。SecY α を過剰生産した場合、染色体由来のSecY蓄積量が減少した。そしてSecY+SecY α の蓄積量の総和が、野生株におけるSecYの蓄積量にほぼ匹敵する(SecYとSecY α の量比はそれらの合成速度の比を反映している)。このような結果は、SecYとSecY α が細胞内で安定な存在状態となることにおいて互いに競合していることを示している(なお、優性分泌欠損を起こすSecY^{d1} α [後述]もこの競合に参加できる。図2-1B、レーン4)。前節で述べたTauraらの結果と併せて考えると、この安定な存在状態とはSecY-SecE複合体そのものであると考えることができる。

2-3: 優性欠損secY変異

前節では野生型SecYとSecY α がSecEとの複合体形成の際競合していることを示したが、当研究室のShimoikeらは優性欠損secY^{d1}変異を用いた研究を行い、SecY^{d1}が野生型SecYと競合してSecEと不活性複合体を形成することを示唆している^[66]。

Shimoikeらは染色体上に野生型遺伝子が存在していてもマルチコピー状態で分

泌阻害を示す優性欠損 $secY$ 変異を分離し、 $secY^{d1}$ と命名した（前述）。この変異は $SecY$ のC 5 領域とTM 9 領域との境界部分に3 アミノ酸の欠失をもたらすものである。 $secY^{d1}$ による優性分泌阻害は、 $secE$ の過剰発現によって抑制される。このような現象を彼らは以下のように考察している(図2-2: extragenic suppression)。

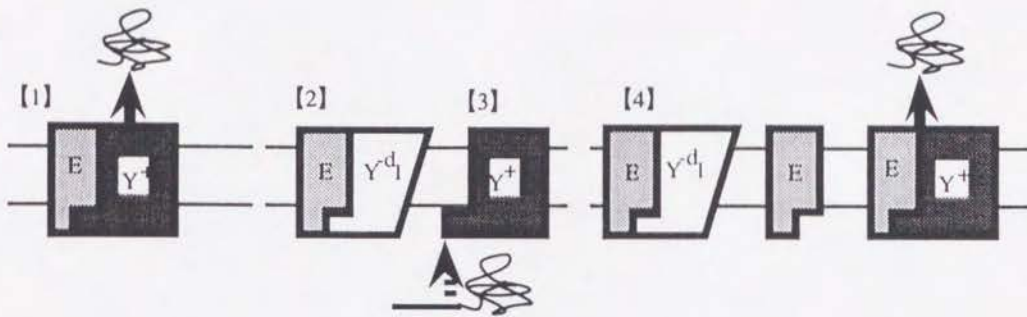


図2-2:優性欠損 $secY^{d1}$ 変異による分泌欠損とその抑制 1

【1】 $SecY^{d1}$ は膜透過促進活性を失っているが $SecE$ との結合能を有する

【2】 過剰生産された変異 $SecY^{d1}$ が野生型 $SecY$ と競合し、細胞内での量が限定されている $SecE$ と結合する

【3】 その結果野生型 $SecY$ が $SecE$ との複合体を充分量形成できなくなり、その結果細胞内で分泌阻害が起きる

【4】 $SecE$ を過剰生産することにより野生型 $SecY$ が $SecE$ と充分量の複合体を形成できるようになり、細胞は分泌活性を回復する

上のようなモデルで優性欠損変異、及びそれが過剰生産 $SecE$ によって抑制されることが説明できる。

2-4: 優性欠損変異 $secY^{d1}$ を抑制する変異の分離・解析による、 $SecY$ 上の $SecE$ との相互作用に関する部位の追求

前節では、SecEとの複合体形成の際にSecY^{d1}が野生型SecYと競合するとのモデルを提示した。本研究ではこのモデルに基づき、SecY上のSecEとの相互作用に与える部位を見出すことを試みた（図2-3：Intragenic suppression）。

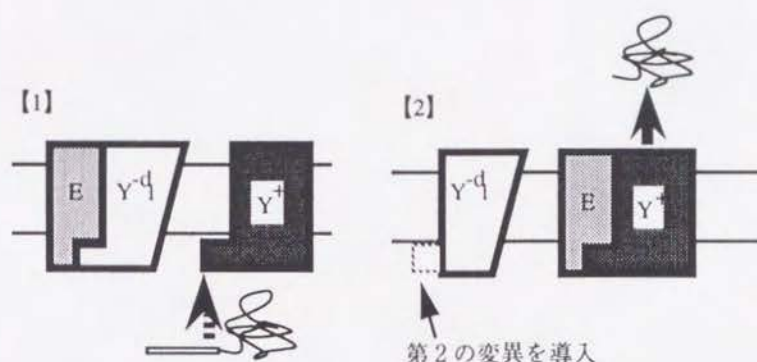


図2-3:優性欠損secY^{d1}変異による分泌欠損とその抑制2

【1】 SecY^{d1}はSecYと競合してSecEと不活性複合体を形成し、野生型の複合体形成を妨げるので細胞は分泌機能の欠損を起こす。

【2】 ここでSecY^{d1}中に、secY^{d1}に加えてさらに第2の変異を導入し、もはや分泌欠損を起こさなくなったものを分離する。すなわちsecY^{d1}に対する遺伝子内抑制変異(Intragenic suppressor)を分離する。このようにして得られた抑制変異はSecEとの相互作用能を失わせるものであることが期待される。そのような遺伝子内抑制変異の位置を解析することによりSecEとの相互作用に重要なSecY部位を同定可能であると考えられる。

2-5:SecY^{d1}による優性分泌欠損の抑制変異分離のストラテジー

1) まず最初の試みとして、secY^{d1}に対してランダムなリンカー挿入変異を誘起し、その中からsecY^{d1}による分泌阻害を抑制するものを分離する。このようなリンカー挿入変異は比較的激しい配列の変化を伴うが、SecEとの相互作用に関する限定

された領域が存在するか否かを大まかに知ることができると思われる。

2) 分泌阻害を抑制する変異のスクリーンには、細胞内における分泌活性が正常であるか、阻害されているかをコロニーの色で観察することのできる「*secA-LacZ*法」を用いる^[37]。*secA* 遺伝子は細胞内で分泌阻害が起こると発現が上昇することが知られている^[104]。*secA-LacZ*融合遺伝子を保持する株では分泌阻害に伴い*secA* の発現上昇が起こるので、それにin frameに融合された*lacZ* 部分の発現も上昇し、従って細胞内のLacZ活性が上昇する。この際、寒天培地にLacZの発色基質5-ブロモ4-クロロ3-インドリル β -D-ガラクトピラノシド(XG)を加えておくと、XGがLacZによって分解され、寒天培地上でコロニーが青色を呈する。この際バックグラウンドの発色を抑えて分泌欠損の有無による発色の違いを大きくするため、LacZの競合阻害剤であるフェニルエチルチオガラクトピラノシド(tPEG)を同時に添加する^[37]。分泌阻害が起きていない場合は*secA-LacZ*融合遺伝子の発現誘導が起こらず、XGおよびtPEGを含む培地上でコロニーが白色を呈する。白色コロニーを拾うことによって*secY^{d1}*による分泌阻害が起こらなくなったものをスクリーンできる。

3) 但し(1)(2)のスクリーニングの際、フレームシフト等により*SecY^{d1}*タンパク質そのものが合成できなくなったノックアウト変異が多く得られることが懸念される。これを除外するために前述の*SecY α* のシステムを用いた。まず*SecY^{d1} α* を発現するプラスミドpKY259を構築した。このプラスミドを保持する細胞は、*secY^{d1}*と同様に、分泌阻害を起こす(図3-3、レーン3及び5)。また、*SecY^{d1} α* は*SecY α* 同様、*SecY⁺*と競合して*SecE*と相互作用すると考えられる(前述、図2-2B、レーン4)。すなわち*lacZ α* 配列の付加によっても*secY^{d1}*の性質は影響を受けない。

(1)のリンカー挿入変異を実際にはこのプラスミドに対して行う。(2)でスクリーンした、分泌阻害を起こさなくなった白いコロニーから変異プラスミドを分離

して*lacZ* ω を持つ株に導入する。*LacZ* ω との相補による *LacZ* 活性の有無は XG を含む寒天培地上で確認可能であり、*LacZ* 活性を示しているものをスクリーンすることによって、変異 *SecY*^{d1} α の合成が *LacZ* α 部分まで続いているもののみを分離することができる。このスクリーニングを効率よく行うため、最初の白いコロニーを多数プールしてプラスミド混合物を抽出し、*LacZ* ω 保持菌に導入して今度は青いコロニーをスクリーンすることとした。このようにして *SecY* 領域のノックアウト変異を除外した。

本節では、*secY*^{d1} 変異を抑制する遺伝子内変異分離の原理について解説したが次節では実際の変異分離の実験およびその結果について述べる。

第3章：結果

3-1: *secY^{d1}* 変異を抑制する遺伝子内変異の分離と同定

3-1-1: リンカー挿入変異

まず、前節(3)の目的沿って、*SecY^{d1}α*を発現するプラスミドpKY259を作製した。次にこのプラスミドpKY259をMn²⁺存在化において低濃度のイヌ脾臓DNaseIで処理することにより直鎖化をした。この条件下では、環状2本鎖DNAの両鎖が各々近傍の一カ所で切断されることが多く、切断末端の片側鎖突出塩基数は僅か(数十ヌクレオチド以内)であることが知られている¹⁸⁰⁾。このような直鎖化DNA(4.4kbp; ほぼpKY259の全長のサイズのものを)、アガロースゲル電気泳動、ゲルから4.4kbp断片の切り出しによって分離・精製した後、T4ファージDNAポリメラーゼにより末端を平滑化した。

DNaseIによる直鎖化が全域にわたってランダムに起こっていたことを確認するために、アガロースゲル電気泳動によって分離した4.4kbp断片の一部を、制限酵素PstIによって切断した(図3-1)。その結果PstIによる切断により4.4kbpより短い連続した無数のバンドを生じた(図3-1、レーン2)。以上の結果からDNaseI処理によってプラスミドpKY259全域がランダムに切断されたことを意味している。

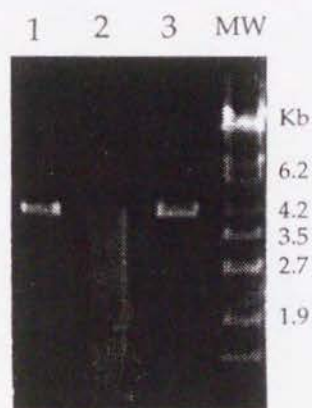


図3-1 プラスミドpKY259はDNaseI処理によってランダムに切断された リンカー挿入変異を導入する過程の、DNaseI処理後のプラスミドpKY259をアガロースゲル電気泳動によって分離・精製した後そのサンプルの一部(レーン1)を取り、4.4kbp断片(レーン2)及び未処理のpKY259(レーン3)をそれぞれ制限酵素PstIで処理し、その切断パターンをアガロースゲル電気泳動で観察した。

次に、このDNAの500倍の分子数の、制限酵素 *Xho*I 認識サイトをもつオリゴヌクレオチド(5'-CCTCGAGG-3'・非リン酸化*Xho* I リンカー)存在下でライゲーション反応を行うことによってリンカー挿入を行ない、再環状化した。次にこれをMV1184株に導入、形質転換コロニー（クロラムフェニコールを含むLB寒天プレート上に生育する。pKY259はクロラムフェニコールに対する薬剤耐性マーカーをコードする）多数（約5000個）を混合してからプラスミドを抽出、制限酵素 *Xho* I で処理した後、アガロースゲル電気泳動によって4.4kbpの直鎖分子を環状分子と区別して分離、精製しライゲーション反応を行った。この操作により、*Xho*I リンカーが挿入されたプラスミドDNAを濃縮した。

ライゲーション反応で再環状化したプラスミドを *secA-lacZ* 融合遺伝子を保持するKI437に導入した。XG、tPEG およびクロラムフェニコールを含むP寒天プレートで白色を呈するコロニーを拾い（計約900コロニー）、それを同種の寒天プレートに多数ストリークした。この寒天プレートを12時間孵卵器で37℃に保ち、成育したコロニーを、クロラムフェニコールを含む10mlのL培養液に混合し懸濁した。このプールからプラスミド混合物を分離した。このプラスミドを *lacZ* ω 断片を持つ株MV1184に導入した。XGを含むLB寒天プレート上で青色を呈する88個のコロニーからプラスミドをそれぞれ分離した。

3-1-2: リンカー挿入変異の解析

上記で分離したプラスミドを制限酵素 *Hind* III、*Sca* I または *Eco* RI のいずれかと *Xho* I との組み合わせで切断し、その断片の分子量を測定した。その内23個が *secY* をコードする領域にリンカー挿入変異を持つことが推定された。

次にこれらのプラスミドを再度KI437株に導入し、XG及びtPEGを含む寒天培地上で青色を呈さないことを確認した。次に正常量の *SecY*^{d1 α} 融合タンパク質が合成さ

れているかを調べるために、細胞をパルスラベルし、SecYに対する抗体を用いた抗体沈殿によりSecY^{d1} α を回収、SDS-PAGEで分離したのちバイオイメージアナライザーで放射能の取り込まれたバンドを画像化して合成量を確認した。リンカー挿入をした変異SecY^{d1} α は、電気泳動時に概ねSecY^{d1} α より若干大きな移動度を示した(図3-3A:後述)。

またリンカー挿入によってsecY^{d1} 変異による分泌障害が実際に抑制されたか否かを確認した。パルスラベル実験によりマルトース結合タンパク質(MBP)及びOmpA-タンパク質の前駆体の蓄積を観察した(図3-3B、レーン3、5)。secY^{d1}、およびsecY^{d1} α を保持する細胞では、分泌障害が起こっていることを示すMBP、OmpAの前駆体蓄積が観察されたが、リンカー挿入を伴うsecY^{d1} α 保持細胞中では、前駆体の蓄積はこの実験条件ではほとんど観察されず(図3-3B、レーン6~12)、野生株(図3-3B、レーン1)と同等であった。

上記SecY^{d1} α の合成及び分泌障害の有無の2つの点を確認し、SecY^{d1} α を合成し分泌障害を引き起こさない11の変異プラスミドの塩基配列を決定した。その結果、全ての変異はSecY配列の中央部分であるC4~TM7領域、特にC4領域に集中し、かつリンカー挿入位置は欠失を伴っていた(図3-2)。合成された融合タンパク質の電気泳動移動度はその挿入/欠失から予測されるものとよく一致した(図3-3A、レーン6~12)。変異はそれぞれX4、X17、X54、X101、X34、X63と命名した(X4が6つ重複していた。この重複はスクリーニングの段階で増殖した細胞中の同一クローンを、最終的に複数得たことによるものであると考えられる)。リンカー挿入自体がC4領域へ集中していた可能性は、リンカー挿入後のプラスミドをインジケーター株KI437に導入し、そこからXGを含む寒天培地上での色に関わらず無作為に36個のコロニーを選択しプラスミドを抽出、リンカーの挿入位置を調べたところ、挿入位置はsecY領域以外の場所も含めてプラスミド全域に点在していた(プラスミドの制限酵素による解析のデータ省略)ことから否定できる。すなわち抑制変異がC4

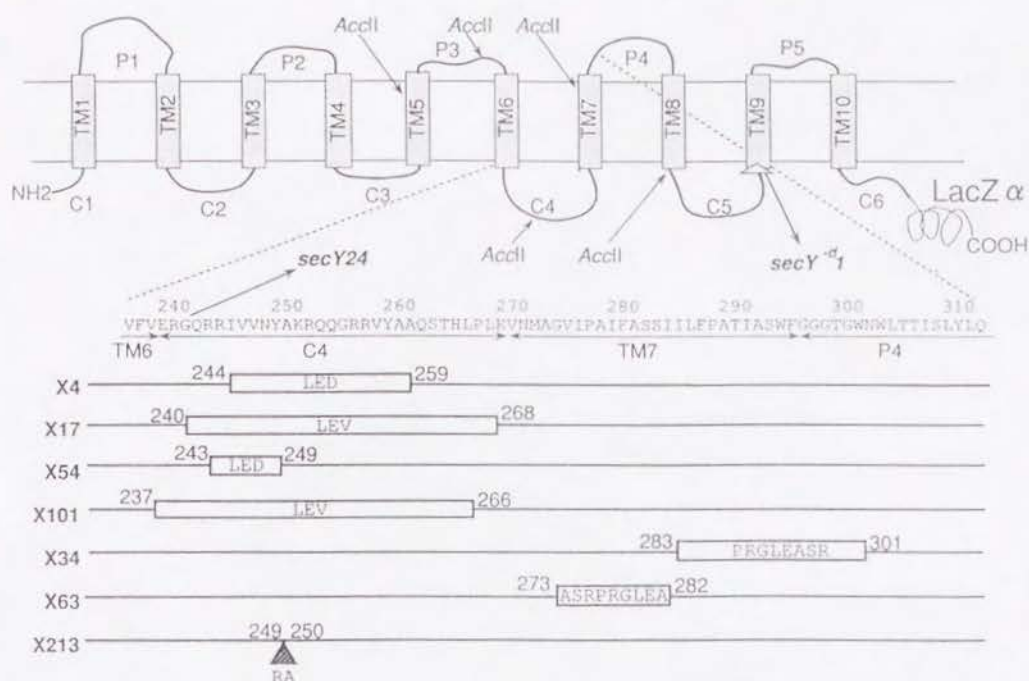


図3-2 *secY^{d1}*を抑制するリンカー挿入／欠失変異位置とそのアミノ酸配列変化 P1～P5：ペリプラズム領域、TM1～TM10：膜貫通領域、C1～C6：細胞質領域。アミノ酸配列（1文字表記）上の番号はアミノ末端のメチオニンを1としたものである。分離された変異(X4、X17、X54、X101、X34、X63、X213)を表す配列中の□及び()内の数字は欠失の両端のアミノ酸残基位置を表し、□内の配列は挿入されたXhoIリンカーにより加わった配列である。なおX213変異は欠失を伴わない2アミノ酸Arg-Alaの挿入である。塩基配列欠失はそれぞれの変異で以下の結果であった（番号はCerettiらの*spc*オペロンの配列番号に従う^[105]）。X4, 5025-5065; X17, 5013-5092; X54, 5022-5035; X101, 5004-5086; X34, 5143-5193; X63, 5114-5134。またリンカー由来の塩基5'CCTCGAGG3'がX4、X17、X54、X101へ、(5'CCTCGAGG3')₃がX34とX63へ、5'CTCGAG3'がX213へそれぞれ挿入された。

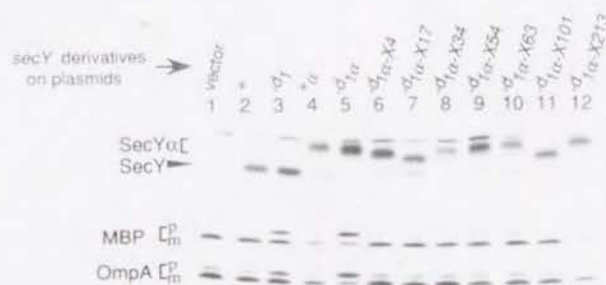


図3-3 (A)リンカー挿入変異*secY^{d1}*遺伝子からの変異タンパク質(SecY-d1X α)の発現 各変異プラスミドを保持するK1437株をそれぞれ37℃で生育させた後[35S]メチオニンを用いて30秒間パルスラベルした。TCA処理により全タンパク質を沈殿させた後、再度SDSにより可溶化し、SecYに対する抗体を用いて抗体沈殿反応を行った。SDS-PAGEによるタンパク質の分離後、標識タンパク質をBAS2000バイオイメーリアナライザーで画像化した。レーン1：pKY238(ベクター)、レーン2：pKY248(*secY⁺*)、レーン3：pKY247(*secY^{d1}*)、レーン4：pKY258(*secY⁺* α)、レーン5：pKY259(*secY^{d1}* α)、レーン6～12：パネル上部に表記した、*secY^{d1}* α への各リンカー挿入変異プラスミド。(B)リンカー挿入変異*secY^{d1}*遺伝子を発現する細胞内におけるタンパク質の分泌 (A)において、SDSで可溶化したサンプルを外膜タンパク質OmpA及びペリプラズムのマルトース結合タンパク質(MBP)に対する抗体を用いて抗体沈殿した。以下の処理、及びパネルは(B)と同等である。p:前駆体、m:成熟体をそれぞれあらわす。

領域に集中したことは、変異導入の際のリンカー挿入位置の偏在によるアーティファクトではない。

3-1-3:制限酵素処理によるリンカー挿入変異

DNaseIによる切断とリンカー挿入による変異では、挿入とそれに伴う欠失というかなり大きな配列変化をもたらす。このような欠失を伴わないリンカー挿入変異を得るために、プラスミドの1カ所切断を低濃度の制限酵素 *Acc II* によっておこなった。*Acc II* によるDNA切断末端は平滑であるので、フレームを合わせるために *Xho I*-リンカーとして5'-CTCGAG-3'を用いた。以下の操作はDNaseI処理の場合に従った。*secY* には *Acc II* 切断部位が5カ所 (図3-2 図中「*Acc II*」で示す) 存在する。その内細胞質領域4番目の切断箇所におけるリンカー挿入変異のみが *secY*^{d1} の抑制変異として分離された (図3-2: X213と名付けた)。これはArg-Alaの2アミノ酸挿入をもたらすものであった。*Acc II* による変異導入で、*LacZ* ω を相補したことにより *LacZ*-活性を持つもの16の内、8個が同じC4領域にある *Acc II* 認識部位へのリンカー挿入変異であった。その他TM6-C4-TM7の大きな欠失をもたらすもの2個も得られた。残りの6クローンは融合タンパク質を合成しないものであった。*Acc II* の認識サイトは *secY* 領域中に5ヶ所存在するが、KI437株中での分泌阻害の有無に関わらず無作為に分離したプラスミドのリンカー挿入位置を解析すると、*secY* 中の5ヶ所の切断部位全てを含むプラスミドの全領域にリンカー挿入変異が見いだされた (制限酵素処理による解析のデータは省略)。X213以外の4カ所での挿入変異はいずれも in frame に起こったが *secY*^{d1} を抑制せず、C4領域のX213変異のみが特異的に *secY*^{d1} を抑制するものであった。

大きな欠失を伴わない変異も、DNaseI処理による場合と同様C4領域に得られた。

DNaseI、制限酵素Acc IIいずれを用いてリンカー挿入を行った場合でも、*secY^{d1}*による分泌阻害を抑制する変異は、C4領域のものが選択的に分離された。

3-1-4: リンカー挿入／欠失変異が*SecY^{d1} α*の安定性に及ぼす影響

リンカー挿入の結果、*secY^{d1}*による分泌阻害を抑制する変異が選択的にC4領域内に分離された。これらの挿入／欠失変異によって極端に*SecY^{d1} α*の安定性が低下した場合、見かけ上の*secY^{d1}*の抑制はそれらの分子が野生型*SecY*と競合する機会を失ったためであると説明することもできる。変異遺伝子を持つプラスミドからは変異*SecY^{d1} α*が発現しており（図3-3A、レーン6～12）、30秒間のパルスラベルで標識される放射エネルギーは*SecY^{d1} α*（図3-3A、レーン5）と比較して大きな差はないので、少なくともこの実験条件下では極端な不安定性は確認できない。この問題をさらに詳細に検討するため、*SecY^{d1} α*とX4、X17及びX213の細胞内における安定性をパルス=チェイス実験によって調べた。「背景」で述べたように、過剰生産*SecY*の大部分は、合成後非常に速やかに分解され、これがパルス=チェイス実験では約5分間にわたって観察できる。この段階における*SecY α*分解速度はリンカー挿入変異の有無によって大きな変化がなかった（図3-4）。これはリンカー挿入変異によって、元々不安定な単独*SecY^{d1} α*がそれ以上には不安定化されないことを示している。また、合成後5分後以降でも、リンカー挿入を伴うものは*SecY^{d1} α*よりも分解がさらに進んだ。すなわち*SecY^{d1} α*（リンカー挿入変異なし）に見られるような安定なポピュレーションがあまり見られなくなる。安定なポピュレーションは*SecE*との相互作用が起こった分子を表しているものとすれば（「背景」参照）、変異タンパク質が*SecE*と相互作用できないとの考えと合致する。

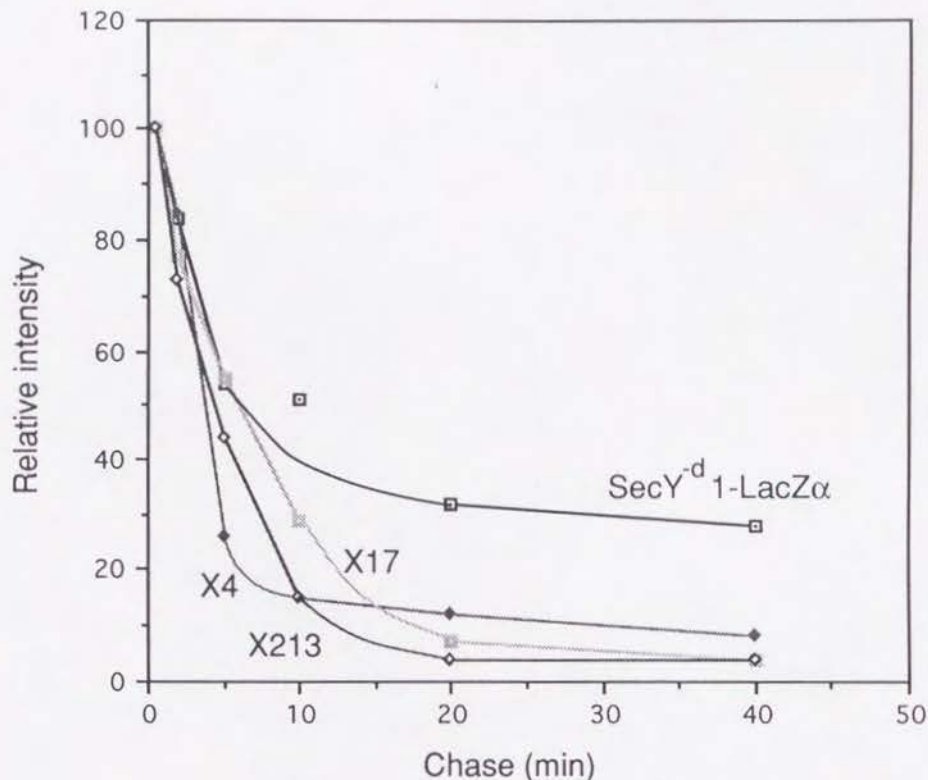


図3-4 リンカー挿入がSecY^{d1}αの安定性に与える影響 プラスミドpKY259-、或いはそれにリンカー挿入変異(X4、X17、X213)を伴ったものを保持するBB030株を37℃で生育させた後、³⁵Sメチオニンを用いて30秒間パルスラベルした。非標識メチオニンによって図に示した時間チェイスした後、一定量の培養液をTCA処理して全タンパク質を沈殿させた後、再度SDSにより可溶化し、SecYに対する抗体を用いて抗体沈殿を行った。SDS-PAGEによる分離後、SecY^{d1}αの分子量(図2-1参照)を持つ標識タンパク質をBAS2000バイオイメージアナライザーで画像化し、各SecYバンドの放射活性を測定した。パルスラベル終了時から30秒後の値を100とした場合の各チェイス時間における相対値をプロットした。

3-1-5: リンカー挿入／欠失変異のトポロジーや膜挿入に対する影響

また、リンカー挿入／欠失によって膜への組み込みやその配向性が攪乱された場合でも野生型SecYと競合不能になり、やはりsecY^{d1}を抑制しうる。特に膜貫通領域に起こった変異ではこの可能性は無視し得ない。膜組み込み型タンパク質の膜貫通領域とその前後の電荷分布は、その膜貫通部位の膜における配向性を決定する情報(Stop-Transfer、Start-Transfer配列^[82])を含んでいると考えられている。実際に、TM7領域のsecY^{d1}抑制変異(X34、X63)は膜組み込み異常で抑制が起こるのかも知

れない。細胞質領域であるC4領域の内部に起こった挿入／欠失変異ではそのような膜組み込み異常の可能性は少ないと考えられる。リンカー挿入／欠失によってC4領域の全長は短くなるが、挿入／欠失による変異全体の傾向としては、領域の親水性やトータルの電荷を大きく変化させたりするものはない。

X4抑制変異が膜配向性を大きく乱さないものであることを、TnphoA法^[82,83]によって確認した。この方法は大腸菌の膜タンパク質の配向性を解明するのに有用な手法であり、複雑な構造を持つSecY^[64]やラクトース透過酵素(LacY)^[84]の膜配向性の決定にも使われた。標的とする膜タンパク質をコードするプラスミド上に、TnphoA（アルカリ性フォスファターゼ遺伝子（*phoA*）を挿入した構造を持つトランスポゾンTn5）をランダムにトランスポジションさせ、膜タンパク質遺伝子と*phoA*との融合遺伝子を作る。PhoAは本来の局在場所であるペリプラズムに移行して初めてプロテアーゼ耐性の正しい高次構造を取ることができ、活性を発現しうる。膜タンパク質-PhoA融合体のうち、膜タンパク質のペリプラズム領域に融合サイトが存在する場合、PhoA部分が直前の膜タンパク質配列中の「透過シグナル」の働きでペリプラズム側に移行してそこで酵素活性を発現するが、逆に細胞質側に融合サイトを持つものはPhoAが細胞質に留まり、活性構造を取れない。

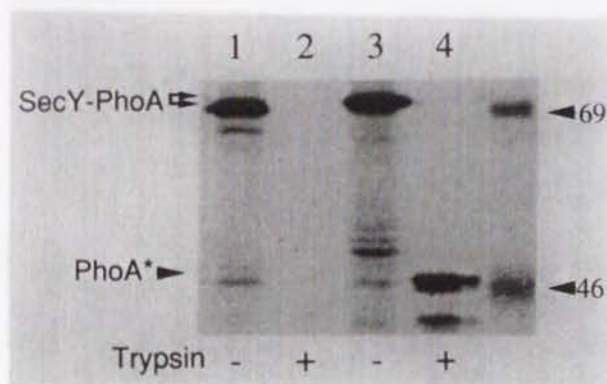


図3-5 アルカリ性フォスファターゼ(PhoA)の融合による、X4変異を持つSecY^{d1α}の膜配向性の解析 SecYのLys³⁸(C4領域)に融合したPhoAを発現するプラスミドpYXP268(レーン1、2)、またはGly²⁹⁹(P4領域)に融合したPhoAを発現するプラスミドpYXP299(レーン3、4)を保持するBB030株を^[35S]メチオニンで5分間パルスラベルした。浸透圧ショック及びリゾチーム処理によるスフェロプラスト化後、界面活性剤Triton-X100で溶菌させた。これに0(レーン1及び3)または50-(レーン2及び4) mg/mlのトリプシンを加え0℃、30分処理した後、トリプシン阻害剤存在下でPhoAに対する抗体で抗体沈殿を行い、SDS-PAGEによる分離後標識タンパク質をBAS2000バイオイメージアナライザーで画像化した。図中PhoA*は、PhoAのトリプシン耐性断片^[85]を表す。

X4変異を持つSecY^{d1}αをコードするプラスミドに対してTnphoA法を適用し、高いPhoA活性（PhoAの発色基質である5-ブロモ4-クロロ3-インドリルリン酸=XPを含む寒天プレート上で青色を呈するものとして認識できる）を示す融合体を発現するプラスミドを分離した。それらの制限酵素地図を作製することによって*phoA*遺伝子融合位置を求めたところ、野生型SecYのペリプラズム領域における融合体が多数分離された。融合箇所の分布はAkiyamaらが野生型SecYに対して行った実験の場合と類似していた。特に融合サイトがP4領域およびP5領域に存在するものが各々5つ、2つ存在したが、P4領域における融合体のうち一つ(SecY-X4-PhoA299とする)の融合点（Gly²⁹⁹）は、Akiyamaらによって報告された*secY-phoA*融合遺伝子11-1と同一のものであった。これらの結果はX4変異によってP4、P5領域のペリプラズムへの配向は変化を受けないことを示唆するものである。さらにC4領域の配向がX4変異によって変化するか否かを調べるために、Lys²⁶⁸(C4領域のC末端部分)にPhoA配列が続く融合タンパク質（SecY-X4-PhoA268）を発現するようなプラスミドpYXP268を、*secY-X4-phoA299*（pYXP299がコードする）のTM7-P4領域を部位特異欠失させることによって作製した。SecY-X4-PhoA268を発現する株はXPを含む寒天培地上で青色を呈さず、またPhoA活性はSecY-X4-PhoA299を持つ株の300分の1以下であった。次にpYXP268及びpYXP299を保持する株をパルスラベル、続いてスフェロプラスト化し、細胞を界面活性剤Triton-X100で破壊した後トリプシン処理を行った。PhoAドメインはペリプラズムに移行すると、プロテアーゼ耐性構造を取ることから、細胞破壊後にトリプシン処理を行い、プロテアーゼ耐性のPhoA断片を生ずるか否かで、PhoAドメインの局在性の指標とすることができる^[85]。SecY-X4-PhoA268は、予期されるようにSecY-X4-PhoA299よりわずかに小さな分子量のタンパク質として検出された（図3-5、レーン1と3を対比）。SecY-X4-PhoA299はトリプシン耐性なPhoA断片（図中ではPhoA*）を生じたが、SecY-X4-PhoA268ではPhoA*を生じず、全て消化されてしまった（図3-5、レーン2と4を対比）。これらの実験はX4変

異がSecYの膜に対する配向性を大きく変化させるものではないことを示唆している。X4よりも小さな挿入／欠失をもつ変異（X54、X213）の場合も、膜の配向性が大きく変化している可能性は小さいであろう。

3-1-6: SecY^{d1}の膜透過活性自体が、リンカー挿入／欠失変異によって回復した可能性の検討

リンカー挿入／欠失変異によってSecY^{d1} α の膜透過活性自体が回復したためにsecY^{d1}による分泌阻害が解消された可能性も完全には否定しきれない。リンカー挿入によってSecY^{d1} α のSecY活性が「回復」されたの否かを、いくつかのsecY変異に対する相補活性の有無によって調べた。secA-lacZ融合遺伝子を持つsecY39、secY24およびsecY104^[67]各変異株に、X4、X54およびX213各遺伝子内抑制変異をもつsecY^{d1}遺伝子をプラスミドとして導入した。このときこれらの形質転換株はXG及びtPEGを含む寒天培地上で分泌阻害が解消されていないことを示す青色を呈した（データ省略）。なお、SecEの同時過剰生産による優性欠損効果の抑制もSecY^{d1}の「活性回復」によらないことは、SecE過剰生産プラスミドの共存下でも、secY^{d1}のsecY変異に対する相補活性が観察されなかったことから示された。secY^{d1}は遺伝子外因子（SecE過剰生産）、あるいは遺伝子内（リンカー挿入／欠失変異導入）変異によって分泌阻害を抑制した場合のいずれにおいてもsecY変異を相補することはできなかった。このことは、SecY^{d1}は膜透過活性を持ちえないとの基本的仮定と矛盾しない。

上記の実験による検討の結果、3-1-4, -5, -6で示した機構によってsecY^{d1}による優性分泌欠損が解消されたという可能性は少ない。

3-2:secY24 変異の解析

3-2-0:secY24 変異解析の意義

secY^{d1}変異の抑制変異位置の解析結果から、SecYのC4領域がSecEとの相互作用に重要であることが示唆された。

しかし上記のリンカー挿入変異の多くはかなり大きな欠失・挿入をC4領域に引き起こす。この領域のミスセンス点変異がsecY^{d1} による優性欠損変異を抑制するかどうかを調べることは、SecY-SecE相互作用のあり方について更なる知見を得るために重要である。このC4領域に変異を起こすものとしては唯一、当研究グループによって分離されたsecY24 が知られている^[65]。この変異はGly²⁴⁰をAspに変化させる点変異であり、この変異を持つ株は高温感受性の分泌欠損を示す。もしC4領域がSecEとの相互作用に重要であるならば、C4領域のsecY24 変異はSecEとの相互作用に変化をもたらすものである可能性がある。

3-2-1: 細胞質領域 4 に変異のあるsecY24 もsecY^{d1} 変異を抑制する

そこで、secY24 もsecY^{d1} を抑制するかどうかをしらべた。secY^{d1} に加えてさらにsecY24 変異を二重に持つプラスミドpKY324を作製し、それを保持する株の分泌能をsecY^{d1} 変異のみを持つプラスミドpKY241の場合と比較した。パルスラベル実験によって分泌タンパク質OmpA及びMBPのプロセッシングを観察すると、pKY241を保持する株では分泌阻害が起きていることを示す前駆体の蓄積が観察されたが（図3-6；レーン2）、secY24 及びsecY^{d1} 両方の変異を持つプラスミドpKY324を保持する株では、このパルスラベル実験の条件ではほぼ成熟体のみがラベルされた。すなわち分泌阻害が観察されなかった（図3-6；レーン3）。

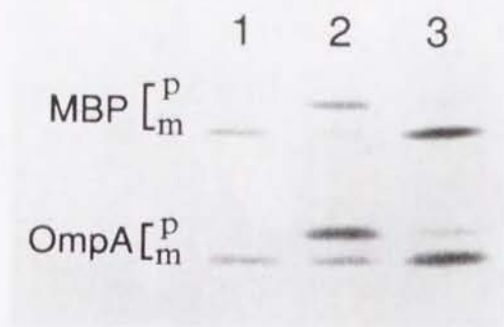


図3-6 *secY24* による *secY^{d1}* 変異の遺伝子内抑制 pKY226 (*secY⁺*; レーン1)、pKY241 (*secY^{d1}*; レーン2)、pKY324 (*secY24* 及び *secY^{d1}* の2重変異; レーン3) をそれぞれ保持するBB030株を37℃で生育させた後、³⁵S]メチオニンを用いて30秒間パルスラベルした。TCA処理して全タンパク質を沈殿させた後、再度SDSにより可溶化し、OmpA及びMBPに対する抗体を用いて抗体沈殿した。SDS-PAGEによる分離後標識タンパク質をBAS2000バイオイメージアナライザーで画像化した。p: 前駆体、m: 成熟体をそれぞれあらわす。

3-2-2: SecY24変異タンパク質はSecE過剰生産によって安定化されない

既に説明したように過剰生産されたSecYは細胞内において速やかに分解される。この分解はSecEの同時過剰生産によって著しく安定化される。SecYが単独では不安定であり、SecEとの複合体を形成することによってはじめて安定に存在できる。もしSecY内の変異によってSecEとの相互作用が弱くなれば、SecEの過剰生産によって安定化されなくなることが考えられる。*secY^{d1}* に対する抑制効果より、*secY24* 変異はSecEとの相互作用に欠損をもたらすものであると示唆されたが、SecEによる安定化を指標にしてこの可能性をさらに追求した。

多コピープラスミドから野生型SecY、あるいはSecY24タンパク質を発現させ、SecEの同時過剰生産によるそれらの細胞内蓄積量を免疫ブロッティング法で調べた(図3-7)。SecYタンパク質を過剰生産するプラスミドを保持する細胞中では、SecEの同時過剰生産によってSecYの蓄積量が増加しているのが観察された(図3-7A、レーン1)。一方SecY24タンパク質を過剰生産している細胞中では、SecEの過剰生産では蓄積量がほとんど増加していなかった(図3-7B、レーン1)。染色体上の *secY⁺* から発現される基底量のSecY(図3-7、レーン3)以外のほとんどのSecY

(SecY24)分子はプラスミド由来であるので、SecY24を発現するプラスミドを保持する細胞中で、SecEの過剰生産によるSecYの蓄積が起こらないのは、SecY24タンパク質がSecEによって安定化をほとんど受けないことを示している。

次に、SecEの同時過剰生産が、過剰生産したSecY及びSecY24の安定性に及ぼす影響をパルス=チェイス実験で調べた。過剰生産したSecY及びSecY24は単独で速やかに分解される（図3-8；-□-及び-○-）が、野生型SecYはSecEの過剰生産によって安定化された（-■-）。SecY24タンパク質はSecE過剰生産による安定化効果が無く、SecE過剰生産を伴わない場合とほとんど変わらない程不安定であった（-●-）。なお、図3-8では実験を42℃で行っているが、37℃で行った場合もほぼ同様であった（データ省略）。図3-8の実験ではSecEの過剰生産で安定化されているSecYへのラベルはチェイス開始後に増加している（-■-）。一方、過剰生産SecEによる安定化がおこらないもの（-□-、-○-、-●-）では、この増加があまり見られない。前者では、チェイス開始後でもSecYポリペプチド鎖の伸長と合成の完了に伴いSecYに取り込まれるラベルが増加する一方、後者の場合は過剰生産SecYの分解が非常に速いので、SecYへのラベル取り込みの増加が見かけ上相殺されるものと考えられる。

3-2-3:SecY安定性に対するydrの効果

上記の免疫プロット実験では、SecEの他にYdrの過剰生産が、SecY（SecY24）の細胞内蓄積量に及ぼす影響も併せて調べた。ydrとは、*secY^{d1}* による優性分泌欠損を、*secE* 同様多コピー状態で抑制する新しい因子として分離・同定されたものである^[86]。Ydrは181アミノ酸残基を持つ、全体として親水性のタンパク質であり、そのカルボキシル末端側に両親媒性の α -ヘリックス構造を持つ可能性が示唆されている。Ydrタンパク質は膜に緩やかに結合しているらしい。Ydrの同時過剰生産でもSecYの細胞内蓄積量は増加する。この蓄積量増加はSecY24タンパク質の場合

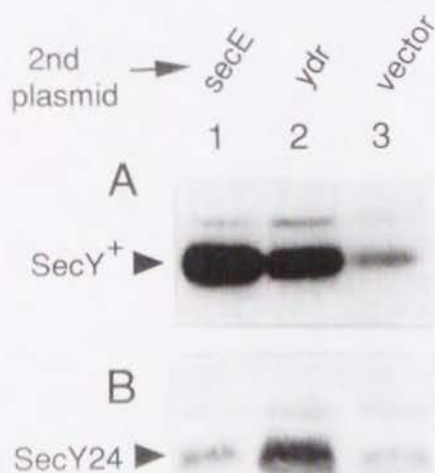


図3-7 過剰生産SecY⁺及びSecY24タンパク質の蓄積に対するSecE過剰生産の効果 野生株TW130-に*secY* (pKY318; A)または*secY24* (pKY132; B)を過剰発現するプラスミドを導入し、さらに*secE* (pKY250; レーン1)、*ydr* (pST30; レーン2)を過剰生産する第2のプラスミド、或いはベクター(レーン3)を導入した。各株を37℃で生育させた後、図2-1(B)の方法に従って免疫ブロッティングで細胞内に蓄積されたSecY量を観察した。

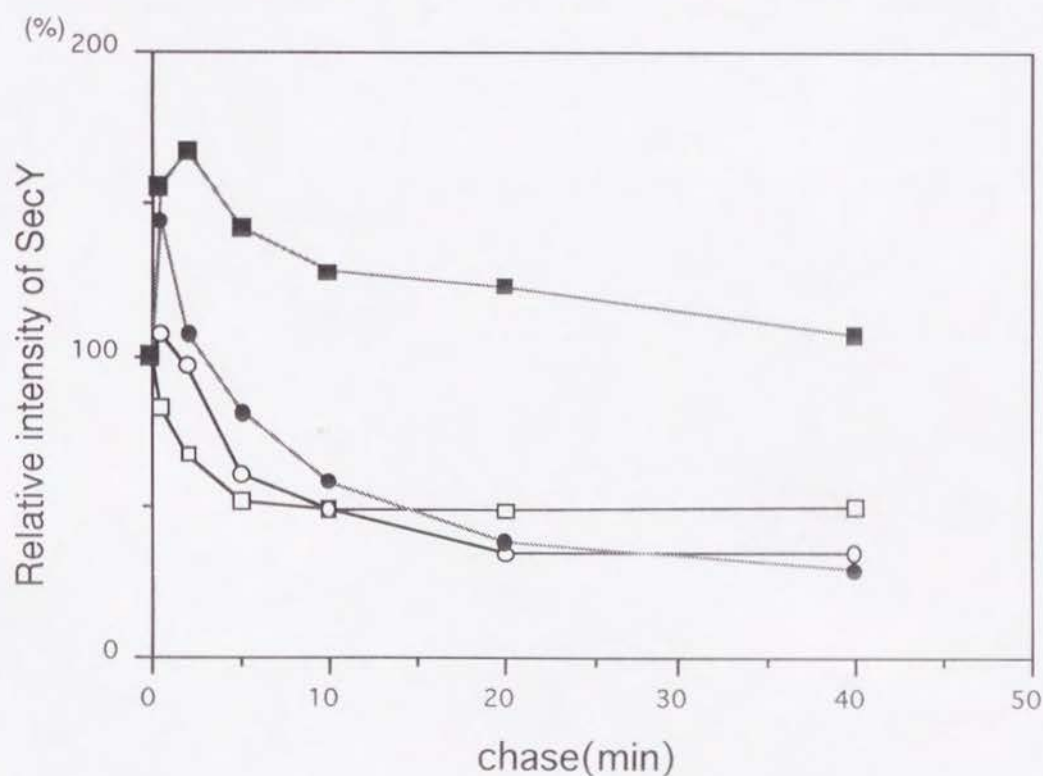


図3-8 過剰生産SecY⁺及びSecY24タンパク質の安定性に対するSecE過剰生産の効果 野生株BB030に*secY*(pKY248)または*secY24*(pKY316)を過剰発現するプラスミドを導入し、さらにSecEを過剰生産する第2のプラスミド(pKY271)またはベクター(pKY225)を導入した。これらの株を42℃で生育させた。以降は図2-9の方法に従ってパルス=チェイス実験を行ったが、パルスラベルが終了した時点(チェイス0分)の標識されたSecY量を100とした場合の各チェイス時間における相対値をプロットした。□, pKY248及びpKY225; ■, pKY248及びpKY271; ○, pKY316及びpKY225; ●, pKY316及びpKY271。

も同様に起こった。Ydr過剰生産によるSecYの安定化は、*secY24*変異によって影響を受けなかった。

Ydrの機能は【考察】で議論したい。

以上の結果はいずれも*secY24* 変異によって、SecE過剰生産によるSecYタンパク質の安定化が起こらなくなっていることを示している。この変異がSecEとの相互作用に影響を及ぼしていることが、さらに強固に示唆された。

3-2-4: 染色体から発現される基底量のSecY24タンパク質は42℃で不安定化される

次に染色体上の*secY24*遺伝子から発現される基底量のSecY24タンパク質の安定性について調べた。野生株及び*secY24* 変異株を $[^{35}\text{S}]$ メチオニンによりパルスラベルした後チェイスを行い、SecYタンパク質の安定性を観察した。細胞を30℃で1分間ラベルし非標識メチオニンの添加でチェイスを始め、この時点から4分後に温度を42℃にシフトさせ、あるいはそのまま30℃に保ちチェイスを継続した。30℃ではSecY24変異タンパク質も野生型SecY(図3-9A)と同様に安定であり、80分間のチェイスにおいても分解は観察されなかった。一方42℃にシフトしたものでは野生型SecY-は30℃と同じように安定である(図3-9C)が、SecY24変異タンパク質は温度シフト後徐々に分解されていくのが観察された(図3-9D)。この結果は、*secY24*変異によって高温(42℃)でのSecEとの相互作用が低下するためであるとの考えに合致する。

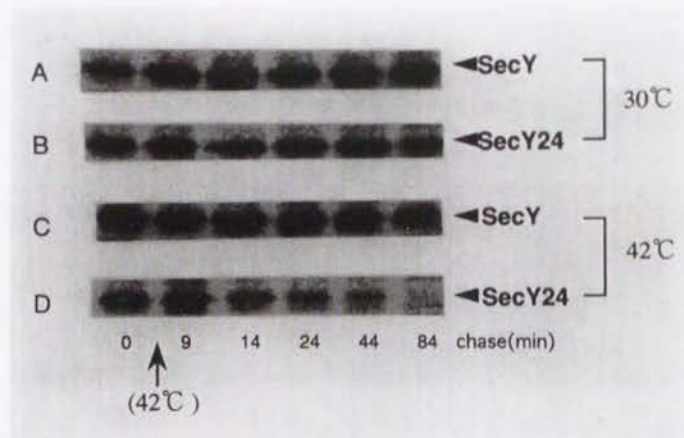


図3-9 基底レベルで発現するSecYの安定性に及ぼすsecY24変異の影響 AD202(secY;A及びC)とAD208(secY24B及びD)を30℃で生育させ、 $[^{35}\text{S}]$ メチオニンで1分間パルスラベルした後、非標識メチオニンを加え図に示した時間チェイスし、一定量の培養液をTCA処理して全タンパク質を沈殿させた後、再度SDSにより可溶化し、SecYに対する抗体を用いて抗体沈殿を行った。SDS-PAGEによる分離後標識タンパク質をBAS2000パイオイメージアナライザーで画像化した。なお、A及びBについては30℃に保ったままチェイスを継続したが、C及びDはチェイス開始4分後に42℃にシフトさせた。

3-2-5: SecY-SecE複合体の生化学的検出とsecY24変異の効果

3-2-5-1: 複合体検出の方法

以上の結果から、SecYタンパク質のC4領域に位置する変異secY24によってSecY-SecE相互作用が弱められることが示唆された。より直接的にSecY-SecE複合体を検出することにより、この問題をさらに検討した。

Brundageらは大腸菌膜を非イオン性界面活性剤1-O-n-オクチル- β -D-グルコピラノシドで可溶化し、SecYに対する抗体を用いた非変性条件下の抗体沈殿実験によってSecY、SecE、BandIタンパク質を複合体として検出した〔I77〕、「背景」参照）。

ここではBurandageの方法に従い、*secY24* 変異株から得た膜を可溶化した後の非変性抗体沈殿でSecEがSecY24タンパク質と複合体を形成しうるかを観察した。野生株及び*secY24* 変異株を30℃で $[^{35}\text{S}]$ メチオニンによりパルスラベルし音波破碎、遠心分離により膜画分を回収した。膜を尿素処理することによって表在性膜タンパク質を除き、1-O-n-オクチル- β -D-グルコピラノシドを含む緩衝液で膜を可溶化する。この緩衝液にはグリセロール及び大腸菌のリン脂質も加えられているが、これらの化合物は複合体を安定に保持する役割を持つ。可溶化した膜にSecYに対する抗体を加え免疫沈殿を行った。この際サンプルを2等分し、うち一方には用いた抗SecY抗体の作製に使用した抗原ペプチド（SecYのアミノ末端から20残基迄の合成ペプチド）を抗体と共に添加した。ペプチドの添加により特異的な抗原-抗体反応を拮抗させ、抗体沈殿反応の特異性を確認した。プロテインA-セファロースで抗SecY抗体及びそれに結合した分子を回収した後、SDS-PAGEで解析した（図3-10A）。

3-2-5-2:検出されたバンドの同定

その結果、分子量32KDaと14KDa（仮にバンドA及びBとする）の2つのバンドが抗原ペプチド添加により特異的に競合し消失した（図3-10A）。従ってバンドA及びBが抗SecY抗体によって特異的に沈殿するものであると考えられる。バンドAはSDSゲル上の分子量からSecYと判断される。実際、SDSで変性・可溶化した後抗体沈殿を行ったSecYと同時に電気泳動を行った場合、同じ移動度を示した（データ省略）。バンドBは以下の実験からSecEであると結論した。すなわち、放射性標識をしない膜可溶化物から抗体沈殿を行い、抗体沈殿で回収したタンパク質をSDS-PAGEで分離した後抗SecE抗体で免疫ブロッティングを行うと、抗原SecYペプチドと競合を受ける形でバンドBと同じ移動度を示すバンドが検出された（図3-10B、レーン1・2）。なおこの実験では、より高分子側は抗SecY抗体で検出しているが、SecYの検

出及び抗原ペプチドとの競合も確認できた。高分子領域に不連続に見られる特異的なバンド（ペプチド添加で消失する）はSecYのアグリゲーションであると考えられる。

なお、Brandageらが検出したBandIタンパク質は、用いた実験条件下では検出できなかった。

3-2-5-3: *secY24*変異がSecY-SecE複合体形成に及ぼす影響

野生株ではSecY-SecE複合体を検出することができたが*secY24* 変異株より得た膜可溶化物からは、SecEがSecY抗体による免疫沈降物として検出できなかった（図3-10A、レーン3・4）。これは細胞を37℃で生育させた場合でも同様であった（図3-10A、レーン7・8）。また、図3-10Bで示す免疫プロットング実験によっても、SecEは*secY24*変異株より得た膜可溶化物の抗SecY抗体による免疫沈殿物中には検出されなかった（図3-10B、レーン3・4）。

3-2-5-4: 他の領域の変異がSecY-SecE複合体形成に及ぼす影響

抗SecYによるSecEの共沈殿が、*secY24*変異株からの膜可溶化物からは起こらなかったが、これが*secY24*変異に特異的なものであるかを調べた。

secY24 とは別の、C5領域に変異をもたらす*secY39*変異株^[42]（低温感受性）からも膜を分離し同様の実験を行ったところ、野生型SecYの場合と同様、SecEがSecY39とともに共沈殿した（図3-10A、レーン7・8、細胞は37℃で生育）。また、*secY39*変異を用いた実験を23℃でパルスラベルした場合でもSecEの共沈殿は野生株の場合と変わらなかった（データ省略）。これは、単に分泌阻害が起こっている場合、非特異的にSecY-SecE複合体が検出不可能になるわけではないことを示している。また

secY122^[67] (C 5 領域の変異) を用いた場合でも SecE の共沈殿が正常に観察された (データ省略)。



図3-10 SecY-SecE複合体形成に対する*secY* 変異の効果 (A)AD202(*secY*⁺; レーン1, 2, 5, 6)、AD206(*secY24*; レーン3, 4, 7, 8)及びAD208(*secY39*; レーン9, 10)を30℃(レーン1-4)あるいは37℃(レーン5-10)で生育させ、^[35-S]メチオニンで5分間パルスラベルした。細胞を0℃以下に保ち、ソニケーターによる音波破碎の後6M尿素で処理し、超遠心によって膜画分を回収した。この膜を1.25%の界面活性剤1-O-*n*-オクチル-β-D-グルコピラノシドを含む緩衝液で可溶化した。これにSecYに対する抗体を加えて0℃、2時間保温した後プロテインA-セファロースを加えて抗体に結合したタンパク質を回収した。SDS-PAGEによる分離後、標識タンパク質をBAS2000バイオイメージアナライザーで画像化(レーン1-4)、あるいはオートラジオグラフィーで可視化(レーン5-10)した。なお、奇数番号レーンにおけるサンプルには抗SecY抗体と共に、抗体作成に用いた抗原ペプチドを加えて抗原-抗体反応の競合を行わせ、反応の特異性を確認した。(B)(A)のレーン1-4に対応する非標識サンプルを(A)と同様に処理しSDS-PAGEで分離した後、タンパク質をナイロンメンブレン上に電気泳動的に転写した。このナイロンメンブレンを分子量約25KDaのタンパク質が転写されている部分を境界にして2分割し、高分子量タンパク質が転写されている部分を抗SecY抗体と、低分子量タンパク質が転写されている部分を抗SecE抗体で処理し、以下図2-11と同様にSecY及びSecEバンドを検出した。高分子量部分に連続して見られるバンドは、2次抗体によって認識されたウサギIgGである。

上記の結果が示すように、*secY24*変異株由来の膜可溶化物からはSecY-SecE複合体を検出できなかった。*secY24*変異がSecY-SecE相互作用を弱めるものであることが示された。

結果全体のまとめ

以上の実験によって得られた結果をここでまとめてみたい。

- 1 : *secY*^{d1}による優性分泌欠損を抑制する挿入／欠失変異はC 4 領域に集中した
- 2 : C 4 領域の変異である*secY*24 によって、実際にSecY-SecE相互作用が弱まる。

上の結果から以下のように結論する。

- ・ SecYのC4領域は、SecYとSecE相互作用にとって重要な役割を持っている。

§ 第4章：考察

4-1: *secY*^{d1}の遺伝子内抑制変異解析の結果について

Tauraらは、多くの*secY*変異を分離しその解析をしたところ、優性分泌欠損を示す変異は全てC5及びC6領域（ほとんどがC5）に存在した^[67]。本研究で用いた*secY*^{d1}変異もC5-TM9領域に欠失をもたらすものである。またSecYのカルボキシル末端側をPhoAで置き換えた融合タンパク質（SecY-PhoA）のうち、P4よりアミノ末端側領域を保持するものが優性分泌阻害を示すが、P3～P4間を欠くものは阻害効果がない^[66]。優性分泌阻害を引き起こす複合体モデル（結果-背景参照）に従えば、これらの知見はSecYのカルボキシル末端側に膜透過に必要な「活性部位」が存在し、優性の分泌阻害効果に必要な「相互作用部位」が、よりアミノ末端側、SecY-PhoAを用いた知見によればSecYのP3からP4領域までの間にあるとの解釈で説明可能である。またこれらの優性欠損変異による分泌阻害効果がSecEの過剰生産によって抑制されることから、「相互作用」の相手は主にSecEであると考えられる。

今回の研究では「相互作用部位」をより詳しく位置づけるため、*secY*^{d1}変異に対する遺伝子内抑制変異をリンカー挿入法によって分離した。SecY^{d1}の「相互作用部位」が破壊されれば、SecY^{d1}が野生型SecYと競合してSecEを奪うことができなくなると考えたわけである。このようにして得られた抑制変異はSecYのC4領域に集中した。この領域がSecYのSecEとの「相互作用部位」と示唆されるが、この部位はShimoikeらの研究によって予測された部位（P3～P4）に包含される。

DNaseIによるプラスミドの切断によって得られた変異には比較的大きな欠失が含まれていた。この領域に集中したことがDNaseI切断によるアーティファクトではな

いことは、リンカー挿入後に導入したインジケーター株での分泌阻害の有無によるスクリーニングを経ないコロニーからプラスミドを得、リンカー挿入位置を調べるとプラスミド全域にランダムに起こっていたこと等から示される。大きな欠失によってSecY^{d1} α の構造全体が変化した結果野生型SecYと競合できなくなり、secY^{d1} 変異による分泌阻害を解消するとも考えられるが、制限酵素AccII処理による変異導入で大きな欠失をもたらさない抑制変異がやはりC4領域のみに得られたところから、このような可能性は少ないといえる。X4変異に対するTnphoAランダムトランスポジション法による解析の結果も、C4領域に起こった比較的大きな欠失は、SecYの膜への組み込みや配向性の大幅な変化などをもたらさないことを支持している。

secY^{d1} 優性変異の抑制は、リンカー挿入／欠失変異を持つSecY^{d1} α が極端に不安定化した場合でも起こりうるが、図3-3で示したパルスラベル実験でリンカー挿入変異SecY^{d1}の合成を確認し、また図2で示すパルス=チェイス実験の結果は、リンカー挿入／欠失変異を持つSecY^{d1} α の安定性が、SecY^{d1} α の不安定なポピュレーションと変わらないことを示した。

以上の考察より、今回得られたSecYのC4領域の抑制変異が、SecEとの相互作用を損なうものであると結論した。

抑制変異の一部には欠失部位がTM7領域のものも含まれていた。膜貫通領域における大きな欠失は膜組み込み異常をもたらす可能性があり、secY^{d1} 変異による分泌阻害の解消は、膜配向性異常を含むような大きな構造変化に起因する可能性がある。TM7領域のリンカー挿入／欠失が「相互作用部位」の破壊によるものであるかどうかは不明である。C4領域の変異の多くがリンカー挿入変異に伴いその領域に欠失をもたらしているのと異なり、TM7領域の変異では欠失の長さを補うようにリンカーがポリマーになって挿入されているが、最終的な欠失残基数が多く、また挿入されたアミノ酸には電荷を持つものもやプロリン残基（ α -ヘリックス構造を取りにくく

する) も含まれるので、正しい膜配向性を取れないかも知れない。しかしX63変異に対してTnphoA ランダムトランスポジション法を用いて融合したPhoA部分の配向性を調べたところ、P4及びP5領域での融合タンパク質はPhoAの活性が高いことから(データ省略)、X63のTM7領域の変異では膜組み込みは正常に起こっている可能性も捨てきれない。Osborneらは、シグナル配列の疎水性領域の12アミノ酸を欠失する変異前駆体タンパク質 (*lamB* Δ 60) の分泌を許す*secY*中の抑制変異の中から、TM7領域に11アミノ酸の欠失をもたらす*prlA*507、515 を同定した^[79]。*prlA*507、515 は野生型*secY* が存在せずとも生育可能であり、TM7領域を欠失してもSecYの膜透過活性を保持しているらしいことは、TM7に挿入/欠失を持つX63およびX34抑制変異の膜配向性との関連で興味深い。

4-2: *secY*24がSecY-SecE相互作用に及ぼす影響について

secY^{d1}変異の抑制変異位置の解析結果から、SecYのC4領域がSecEとの相互作用に重要であることが示唆されたが、リンカー挿入変異の多くはかなり大きな欠失・挿入をC4領域に引き起こした。この領域に1アミノ酸置換をもたらす*secY*24についてSecEとの相互作用を検討することは、リンカー挿入変異解析の結果をより詳細に検証することになり、またこの領域のSecE相互作用における重要性を確認できる。

*secY*24変異は、分離されたリンカー挿入/欠失変異と同様、*secY*^{d1}を抑制することを確認した(図3-6)。これは*secY*24が、SecEとの相互作用に影響を及ぼしていることを示唆すると同時に、リンカー挿入変異がC4領域に集中したことに合致する結果となった。

過剰生産されたSecYは速やかに分解されるが同時にSecEを過剰生産すると安定化される。Tauraらは、SecEはSecYを安定化するリミティング因子であると結論している([43]、【背景】参照)。過剰生産されたSecYが、SecEの同時過剰生産によっ

て安定化されるか否かは、SecY-SecE相互作用の指標となると考えられる。SecY24変異タンパク質はYdrによる安定化は観察されたものの、SecEによる安定化は全く起こらなかった。この結果は、SecY24変異タンパク質はSecEとの相互作用が異常となっているということを支持する。また、細胞内において過剰生産を伴わない基底状態の発現レベル（＝染色体DNAからのみの発現）のSecY24タンパク質が、42℃で不安定化されるという結果（図3-9）は、特に高温でSecY-SecE相互作用が弱まっていることを示唆している。この基底状態での発現レベルのSecY安定性を観察する実験では、*secY24*による42℃での不安定化は温度シフト後直ちに観察されるもののその分解速度は過剰生産されたSecYと比較して緩やか（半減期約15分）である。この緩やかな分解速度を示すことについては2つの解釈があり得る。一つは42℃においても完全にSecY-SecE相互作用が失われたわけではないということ、二つには未同定な因子がSecY24タンパク質を安定化しているということが仮定される。SecE以外にSecYを安定化する因子としてYdr^[86]、Orf12^[43]が知られている。いずれも過剰生産することによってSecYタンパク質を安定化する。この安定化はSecEによる場合ほど完全ではない。Ydr、Orf12の遺伝子破壊は分泌能やSecY安定性に影響を及ぼさないこと(Shimoike、Taura)は、両因子が基底状態の発現ではSecY安定化に寄与する可能性が少ないことを示唆している。逆にSecEの発現量が減少する*secE501*変異株中では新規に合成されたSecYの分解がプラスミドで過剰生産した場合とほぼ同等の速度で起こること^[43]、また*secY24*の温度感受性が部分的にはあるが*secE*の過剰供給によって抑制される^[88]ことなどから、前者の解釈がより考えやすいものであると思われる。

基底量のSecY24が42℃で不安定化され、緩やかに分解されることから、*secY24*変異がどのように分泌阻害を引き起こすかを考察できる。*secY24*変異株では、生育温度を非許容温度(42℃)にシフトしてから約1時間以降になって初めて分泌欠損が明確に観察される^[88]。これは、*secY39*変異株では非許容温度にシフトしてから極め

て早く、1分以内に分泌阻害が起こる^[42]のとは対照的な遅さである。基底量SecY24-の42℃での分解のカイネティックス、及びsecY24株が分泌阻害を現すのに時間がかかることを考慮すれば、secY24変異による分泌阻害は、(a)secY24変異によってSecY-SecE相互作用が特に高温で弱まり、SecYがリミテイング因子SecEとある頻度で解離する(b)解離したSecYが分解を始める。相互作用の阻害は完全なものではないのでこの分解は徐々に進む(c)SecYの分解が進行し、ある一定値を下回ると細胞内の分泌タンパク質の膜透過反応を処理しきれなくなり分泌阻害がおこるが、ここまで至るのに約1時間必要である、というような過程で引き起こされると考えられる。この変異によるSecY-SecE相互作用の部分的低下は、直接膜透過促進活性をそのものを損なうものではないように思われる。

4-3:SecEがSecY24と免疫共沈殿されないことについて

野生株、あるいはsecY24変異株から膜を分離し、膜タンパク質を可溶化し抗SecY-抗体を用いてSecYタンパク質とともに共沈殿してくる因子を同定する実験では、可溶化した野生株膜からはSecEの共沈殿が観察された一方、secY24株の可溶化膜ではSecEの共沈殿が見られなかった。SecYの安定化を指標とする実験では、SecEとの相互作用について推察可能であるが、可溶化膜を用いたこの実験はより直接SecY-SecE相互作用の結果を観察したこととなり、secY24変異がSecY-SecE相互作用を阻害することを強く示唆する結果であり、これはsecY^{d1}の遺伝子内抑制変異の解析で得られた、「C4領域がSecYとSecEとの相互作用に重要な部位である」という結論も支持する。低温感受性のsecY39（「活性部位」であるC5領域の点変異）株の可溶化膜からは、野生株同様SecEの共沈殿が、低温(23℃)においてパルスラベルしたものからでも観察されたという結果は注目すべきである。これは、単に細胞内で分泌阻害が引き起こされた場合にこのSecY-SecE相互作用が弱まるわけではないことを示

している。基底状態での発現レベルのSecY24不安定性は42℃において顕著に観察され、高温でSecY-SecE相互作用が弱まっていることを示唆するものであったが、図2の実験では30℃においてもSecY24とSecEの共沈殿が見られなかった。SecY24タンパク質のSecEとの相互作用は、30℃でもある程度低下しており、それは膜を界面活性剤で可溶化した条件での抗体沈殿実験の条件下では、例え全ての操作を低温で行っても結合が維持できない程であるという説明が考えられる。

なお、当研究室のYoshihisaは、アミノ末端にヒスチジントグを付加したSecE (His₆-SecE)を構築し、野生株、*secY24*変異株、*secY122*変異株中で発現させた。各々の細胞から膜を分離し、図3-10とほぼ同様の条件で膜を可溶化させ、それをNi⁺⁺-NTAカラム(His₆部分と親和性を持つ)にロードした。イミダゾールの添加によりHis₆-SecEを溶出したところ、野生株、*secY122*変異株を用いた場合はSecYがHis₆-SecEと共に溶出された。しかし*secY24*変異株の場合、SecY24タンパク質はHis₆-SecEと共溶出されず、flow through画分に見出されるのみであった。この結果も、*secY24*変異が特異的にSecYとの結合を弱めることを示し、SecY-SecE相互作用を阻害するとの考察に合致するものである。

4-4:SecYのC4領域の機能について

C4領域がSecEとの相互作用に重要であることが強く示唆されたが、この細胞質領域は、どのようにSecEとの相互作用に関与しているのだろうか。膜に組み込まれたタンパク質同士の相互作用には、互いの膜貫通領域を介する場合、また細胞質領域相互間あるいはペリプラズム領域相互間を介する場合をそれぞれ想定することができる。

SecEは、カルボキシル末端側の60アミノ酸だけ(C2領域の約25アミノ酸とTM3領域)でも、*secE501*変異の相補^[89]、SecYの安定化^[90]ができ、*in vitro*での再構成実験で

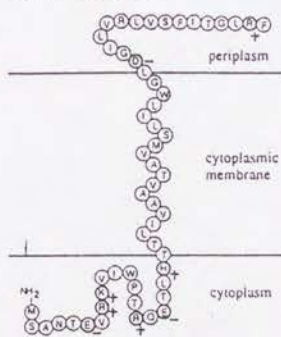
も膜透過活性を持つことが示された。SecYと相互作用するのもこの領域であろう。今回の研究の結果からは、SecYのC4領域とSecEのC2領域とが相互作用しているとするのがもっとも考えやすい仮説であると思われる。SecYのC4領域の重要性は今回の研究によっても示されたが、この領域は他の生物種におけるSecY相同体においても比較的良く保存されている(図4-1)。一方SecEのC2領域もまた、枯草菌の相同体でも保存されている残基がある^[91](図4-2)。SecY-SecE相互作用には、SecYのC4領域とSecEのC2領域が関与してる可能性がある。Osborneらは、膜貫通領域相互(SecYのTM10とSecEのTM3)でSecYとSecEとが作用しあうというモデルを提唱している^[79]。もしこれが真実だとすれば、C4(SecY)-C2(SecE)領域の相互作用と膜貫通領域相互間の相互作用は互いにどのように関係するのであろうか。C4領域が膜貫通領域の立体構造変化を何らかの形で誘起し、TM10(SecY)-TM3(SecE)相互作用を媒介するのかもしれない。ただし、SecYのTM10領域は、大腸菌と枯草菌では比較的相同性が高いにも関わらず、SecEのTM3領域の相同性は低い(図4-2)ので、SecYのTM10領域とSecEのTM3領域との相互作用が一般的に起こっている可能性は低いのかも知れない。この研究によって得られた結果のみでは、SecYのC4領域とSecEのC2領域との相互作用が両タンパク質の会合に一義的な役割を果たすのか、あるいは膜貫通領

	*	
EC	ERGRRIVNYAKRQQGRVYAAQST	HLPIKVN
BL	QQAVRKISIQYAKGSGRSPVPGQST	HLPIKVN
BS	QQAVRKIAIQYAKGIURSPAGGGQST	HLPIKVN
SC	LQAVRKIPQYAKKQSTQRL-GSNAT	YIPIKVN
LL	QQAEKVPQYIKLIQ-GAPTSS	YIPIKVN
CP	QESGRVPVLIARQFAERQKNEPTTEAERRKIQAYIFFQLL	
SS	QEGIRIPWVSARQMGNRVYSERS	YIPIRIN
PL	QEGARKIPWSAKQLI-DGVEDIMRFS	YIPIREFG
CF	QEGIKRIPILISAR-QLGKGQMNKTS	YIPIKIN

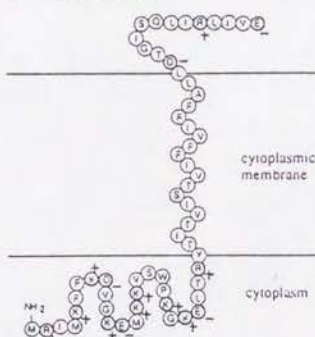
図4-1: 大腸菌SecYのC4領域と他生物のSecY相同体との比較

各アミノ酸配列をClustal-V整列プログラム(D. Higgins)を用いて並べた。secY24 変異位置は*であらわした。生物種の略号は以下の通りである。EC, *Escherichia coli*; BL, *Bacillus licheniformis*; BS, *Bacillus subtilis*; SC, *Staphylococcus carnosus*; LL, *Lactococcus lactis*; CP, *Cyanophora paradoxa*; SS, *Synechococcus*; PL, *Pavlova lutherii* (chloroplast); CF, *Cryptomonas* (F plastid)

A

A. *E. coli* SecEΔ7-78

B

B. *B. subtilis* OrfE

Ydr

18 DAWHEEHK-SWFLSE 31

SecE

74 EARTEVVRKVIWPTREQ 89

SecE (*B. subtilis*)

9 DVGKEMKRVSWPKGKE 24

SecE (*B. licheniformis*)

9 NVGKEMKRVTWPKGKE 24

C. SecEΔ7-78

MSANTEVRKVIWPTREQETLHTTLIVA AVTAVMSLILWGLDGLVRLVSFITGLRF

OrfE MRIMKFFKDVGRKMKVSWPKGKELTRYITVISTVIFVIFALLDTGISQLRLIVE

図4-2: A:大腸菌SecEカルボキシル末端側(SecEΔ7-78)と、枯草菌の相同体(OrfE)とのアミノ酸1次配列比較 Jeong *et al.*(*Molecular Microbiology* 10 133-142 Fig. 4) より引用した。パネルCの*は両者で同一のアミノ酸、・は類似のアミノ酸をあらわす。B: 各生物種のSecEのC2-領域(抄)におけるアミノ酸配列の相同性。Ydr(後述)の類似配列も併記した。

域間の相互作用も同等に重要なのかを結論することは難しい。しかし米国の Beckwith 博士との私信によれば、SecEのC2領域の欠失や置換は、SecE機能の喪失をもたらす一方、TM3領域を他のタンパク質の膜貫通領域と置換してもSecE機能に影響がない^[106]。これは細胞質領域間の相互作用が、膜貫通領域間の相互作用より重要であることを示唆している。今回の研究結果とも併せて、SecYのC4領域はSecEとの相互作用に何らかの重要な役割を果たしていることは明言できるであろう。

4-5: Sec因子の相互作用と複合体形成

SecEが細胞内で果たす機能の一つは、膜透過装置に中心的な役割を果たすSecYと

相互作用し、それを安定化するというところにある（【背景】参照）。*secY24*変異によるSecYタンパク質の不安定化は、この考えに合致する。SecEもまた、SecYと共に膜透過促進活性そのものの一翼を担っているとしても、SecEには最小限、SecY-を安定化させることにより細胞内において、SecYが膜透過活性を果たしうる量に保つという役割があると言うことはできよう。

SecY-SecEに、さらに関与し得る因子の候補がある。*ydr*は、*secY⁻¹*による分泌阻害を多コピー状態で抑制する因子である^[86]。*ydr*過剰発現はSecYの部分的安定化を引き起こすが、*secY24*変異株中での*ydr*過剰発現は致死性である。その時、細胞内で著しい分泌阻害を引き起こす。以上のような知見から、私はYdrがSecEと競合してSecYと相互作用する因子ではないかと考えている。野生株中ではSecYとの相互作用に際して、SecEがYdrとの競合に打ち勝ち、SecYとの複合体を形成可能であるが、*secY24*変異によってSecY-SecE相互作用が弱まると、YdrがSecEに打ち勝って、SecY-SecE複合体の形成を抑える。このためYdr過剰発現により致死性となる。Ydrも、SecEのC2領域の一部に相同な配列を保持することは（図4-2B）、上記の競合モデルとの関連で興味深いことである。*ydr*の遺伝子破壊は分泌能やSecY安定性に影響を与えないため、基底量Ydrの細胞内での機能を推察するのは難しいが、例えばSecY-SecE相互作用に何らかの形で影響を及ぼし、分泌装置に対する制御的な機能を果たしているのかも知れない。

最近、SecY、SecEと共にリポソームへ再構成することにより*in vitro*系での膜透過活性を著しく促進するタンパク質因子が発見され、p12(SecG)と命名された^[92]。SecGは細胞内でSecYとSecEの両者と相互作用しているらしい。

本研究ではSecYとの相互作用に焦点を当て、SecEとの相互作用に関わるSecY領域の同定などを行った。膜透過装置複合体にはさらにSecD、SecFが参画すると考えら

れ、またSecGはSecY-SecEと共にその基幹部分を構成する可能性が高い。従ってこれらの全体像を得るためには少なくともSecGを含めた三者複合体のあり方を解析する必要がある。さらにYdr等のアクセサリー因子による調節の問題もある。本研究はこのような問題への出発点の一つとなるのではないかと考えている。

§ 第4章：材料と方法

本研究では特に記載のない限り、大腸菌遺伝学の操作はMiller^[101]、DNA操作はSambrook^[80]、Asube^[102]らの方法に従った。試薬類は和光純薬、ナカライテスク、Sigma、また酵素類は宝酒造、東洋紡及びNew England Biolabs. の製品を用いた。

材料

4-1：菌株及びファージ

本研究に用いた大腸菌株を以下に示す

大腸菌株	遺伝子型	文献
MC4100	<i>F'araD Δ(argF-lac) U169 rpsL relA flbB deoC ptsF rbsR</i>	93
KI437	MC4100 <i>secA-lacZ</i> (λ PR9)	67
AD202	MC4100 <i>ompT::Kan</i>	94
TW130	AD202 <i>zhd-33::Tn10</i>	67
BB030	KI437 <i>ompT::Kan</i>	本研究
AD206	AD202 <i>secY24 zhd-33::Tn10 rspE</i>	67
AD208	AD202 <i>secY39 zhd-33::Tn10 rspE</i>	67
MV1184	<i>ara Δ(lac-pro) rpsL thi(φ80 lacZ ΔM15) Δ(srl-recA)306::Tn10/F'[traD36 proAB⁺ lacI^Q lacZ ΔM15]</i>	95
BW313	HfrKL16PO/45[<i>lys(62-62)/dut1 ung1 thi1 relA1</i>]	80
CJ236	<i>dut1 ung1 thi1 relA1 /pCJ105 (F' cam^r)</i>	80

ファージは、Kunkelらの方法^[97]による部位特異的変異導入の際にM13KO7を用いた（後述）

4-2：培地

大腸菌培養にはLB培地、P培地、M9培地及び2×TY培地^[93]を用いた（以下）。

LB培地-----1% bacto-tryptone, 0.5% bacto-yeast extract, 0.5% NaCl

P培地-----2% polypeptone, 0.5% NaCl

M9培地-----0.6% Na₂HPO₄, 0.3% KH₂PO₄, 0.05% NaCl, 0.1% NH₄Cl, 1mM MgSO₄, 2μg/ml thiamine

2×TY培地--1.6% bacto-tryptone, 1% bacto-yeast extract, 0.5% NaCl

（寒天培地として使用するときは、それぞれに1.2%のAgarを加えた）

タンパク質放射性標識実験及び免疫プロットティング実験にはM9培地に、L-メチオニン及びL-システインを含まない18アミノ酸を各々20μg/ml、炭素源としてのグリセロール(0.4%)及び、マルトース(0.3%)を加えた。プラスミド保持菌の培養には、その薬剤耐性マーカーに応じてアンピシリン(50-μg/ml)、クロラムフェニコール(20μg/ml)を添加した。2×TY培地は、M13ファージ感染による一本鎖DNAの調整の際に用いた。

4-3：プラスミド

本研究で用いたプラスミドの構築法を以下に示す。

プラスミド名（発現する遺伝子・レプリコンタイプ）；構築概略 の順で表す。

pKY258 (*secY-lacZ α*・pACYC184)；pKY3^[88]の*secY*を含む1.5kbのHindIII断片をベクタープラスミドpKY184^[96]にクローニングした。*secY*と*lacZ*のフレームをあわせるために、部位特異的変異導入をKunkelらの方法^[97]に従って行った。この時用いたオリゴヌクレオチド(60mer)は、*secY*の最後の10コドン、*lacZ α*(pUC9由来)の7番目から16番目のコドンからなるものであった。この操作の後に生じたのがpKY234であり、*secY-lacZ α*融合部分のはHindIIIサイトは失

われない。次に、*lac*プロモータ及び*secY*領域のほとんど（C末端の2アミノ酸のみを欠く）を含む、1.9kbの*Eco*52I断片をpKY234から除き、その部分とpKY44由来の相同な断片（P_{lac}-*secY*）とを置き換える。この結果pBB007を生ずる。最後にpBB007から*secY*領域を含む*Hind*III断片を切り出し、pKY238^[66]にクローニングした。

pKY259 (*secY*^{d1}-*lacZ* α · pACYC184)；上記pKY258作製の際のpKY234の1.9kbの*Eco*52I断片を、pKY241(*secY*^{d1}-^[66])由来の相同な断片（P_{lac}-*secY*）とを置き換えた。以下はpKY258作製時と同一である。

pKY248 (*secY* · pACYC184)；pKY3由来の*secY*を含む*Hind*III断片をpKY238にクローニングしたもの

pKY247 (*secY*^{d1} · pACYC184)；pKY241由来の*secY*を含む*Hind*III断片をpKY238にクローニングしたもの

pKY132 (*secY*24 · pBR322)；pKY12^[88](IQ85株由来の*secY*24を含む断片をpBR322由来のベクターにクローニングしたもの)の、*secY*24変異位置を含む*Sma*I-*Ban*III断片をpKY6^[88]（野生型*secY*をコードするpBR322由来ベクター）の相同部分と置換したもの

pKY316 (*secY*24 · pACYC184)；pKY248の*Hind*III-*Eag*I断片(*secY*領域)をpKY132の相同部分と置換したもの

pKY324 (*secY*24 & *secY*^{d1} double mutant · pBR322)；pKY132の0.3kb *Eco*RI断片（*secY*の3'側〜マルチクローニングサイト）をpKY241の相同部分と置換したもの

pKY250 (*secE* · pACYC184)；[66]参照

pKY271 (*secE* · pBR322)；pKY250の0.5kb *Bam*HI断片を、pKY225（pKY184とはほぼ同一であるが、*bla*遺伝子がpUC119^[95]由来である。この為マルチクローニングサイトの*Pst*Iサイトはユニークなサイトとして利用できる）にクローニングしたもの

pST30 (*ydr* · pACYC184)；[86]参照

pYXP299 (*secY*-X4-*phoA*299 · pBR322)；pKY259-X4に対して行った*TnphoA*ランダムトランスポジションの結果*SecY*-X4-*PhoA*299を発現するようになったプラスミドの*Hind*II-*Pst*II断片(*secY*-X4-*phoA*299を含む)を、pTWV229（pBR322由来ベクタープラスミド、pKY225の*tet*遺伝子を*Eco*T14I処理で除いたもの。M13ファージIntergenic regionを持つ）にクローニングしたもの

pYXP268 (*secY*-X4-*phoA*268 · pBR322)；pYXP299から、下記の部位特異的変異導入で、*secY*のTM7-P4領域を欠失させたもの

方法

4.4：Kunkelらの方法^[97]による部位特異的変異導入

定法に従い、ベクタープラスミドpUC119（前述）に変異導入の目的となる遺伝子（本研究では*secY*及び*secY*-*phoA*融合遺伝子[*secY*のP4領域まで持つもの]）をクローニングし、BW313株またはCJ236株に導入した。M13KO7ファージの感染による一本鎖DNAの調整、合成プライマー（pKY258-作製時のものは上述、pYXP268作製時には、*TnphoA*の29塩基+A+*secY*の30塩基[アンチセンス側]の60mer（5'CCAGGACGCTACTTGTGTATAAGAGTCAGATTTCAGCGCTAAATGTGTGCTCTGTGCAGC3'）を用いた。なお、各プライマーはDNAシンセサイザー380B[Applied Biosystems]を用いて合成した）のアニーリングに続く相補鎖合成反応は、MUTA-Geneキット（Bio Rad）を用いて行った。

4.5：リンカー挿入変異導入及びスクリーニング

主にsambrook等の方法に従って行った^[80]。プラスミドpKY259を塩化セシウム密度勾配遠心法で分離精製後、1 mMのMnCl₂、40 mMのTris.Cl_{pH=7.5}を含む緩衝液中でプラスミド濃度が0.5 mg/ml(全量20 mg)となるよう調整した。3.5×10⁴ units/mlのイヌ脾臓DNaseIを加え室温で2分間処理し、EDTA-を最終濃度が12.5 mMとなるよう添加し反応を停止させた。制限酵素*Acc*IIを用いた反応では、3.5×10³ units/mlの酵素を用い、37℃で30分処理をした。次にこのサンプルから、DNaseI処理によってただ一カ所で切断され直鎖化されたプラスミドDNA(4.4 kbpの長さを持つ)を分離するため、0.5 mg/mlのエチジウムブロマイドを含む1%のアガロースゲル電気泳動を行った。この操作によって2-重鎖環状DNAと直鎖化DNAはゲル上で明確に異なる移動度を示すため容易に分離することが可能である。アガロースゲルから当該のバンドを分離し、GeneCLEANTM (Bio101 Co.)で精製した。次に精製したDNAをT4ファージDNAポリメラーゼを用いて末端平滑化を行い、このDNAの500倍の分子数の*Xho*Iリンカー（非リン酸化5'CCTCGAGG3'、宝酒造、但し*Acc*II処理をしたもの）については

5'CTCGAG3'を用いた)存在下で、Ligation Kit(宝酒造)を用いて再環状化した。これをMV1184株に導入し、20mg/mlのクロラムフェニコール(Cm)を含むLB寒天培地上で得られた形質転換株を、寒天培地に同液体培地を注ぎ懸濁することによって得、ここからプラスミドDNAを再び分離し、制限酵素XhoIで処理した後アガロースゲル電気泳動によって4.4kbpに相当するバンドを分離・精製し、さらにT4ファージDNAリガーゼによって再環状化した。この操作によってXhoIリンカーの挿入が起こったもののみを分離できる。このDNAを分泌阻害インジケーター株KI437に導入し、40 mg/mlの5-ブromo-4-クロロ-3-インドリル- β -D-ガラクトピラノシド(XG)、0.5 mMのフェニルエチルチオガラクトピラノシド(tPEG)及び20mg/mlのクロラムフェニコールを含むLB寒天培地上で白色を呈する形質転換コロニーを滅菌爪楊枝で拾い、同種の新たな寒天培地上に再展開することによってプールの。このプールからプラスミドDNAを分離し、MV1184株に導入した。XG及びCmを含む寒天培地上で青色を呈する形質転換コロニーを分離し、同種の新たな寒天培地上で単一コロニー化した。ここからプラスミドを分離し、【結果】で述べた解析に供した。

4-6:塩基配列決定

塩基配列決定は、dideoxy法^[9]に従った定法により行った。プラスミドDNAを0.2M NaOHで変性させた後、secY配列内の合成プライマー(ヤクルト中央研の左古知行博士からご供与いただいた)をアニーリングさせ、BcaBEST DNAシーケンシングキット(宝酒造)を用いて、 $[^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ (NEN Research Products, 比活性3000Ci/mmol)を用いたインターナルラベル法で反応を行った。

塩基配列決定用のゲルの組成は以下の通りである: 8M尿素, 5.7% Acrylamide, 0.8% $\text{N,N}'$ -methylenebisacrylamide, 72mM Tris.Borate, 1.6mM EDTA

4-7:パルスラベル及びパルスチェイス実験

細胞をM9培地にて培養し、凡そK.U.=30(クレット単位:クレット光電比色計[No.54フィルター]を用いた大腸菌の濁度の単位。1が約 5×10^6 細胞/mlに相当する)の時点で、培養液50ml当たり2~5mCiの $[^{35}\text{S}]$ メチオニン(American Radiolabeled Chemicals, 比活性1100Ci/mmol)を加えることによってパルスラベルを開始した。30秒後、非標識メチオニンを終濃度0.2mg/mlとなるように加えチェイスを開始した。反応は等量の10%TCAを加えることにより止め、同時に細胞を破壊しタンパク質を沈殿させた。チェイスを伴わない実験の場合は一定時間後直接TCAを加えた。0℃で15分間以上静置した後、微量遠心器で4℃、2分間遠心分離を行いタンパク質を沈殿させ、上清を除去後にアセトン1mlを加え洗浄した。4℃で再度遠心した後沈殿をSDS-Tris-EDTA溶液(1%のSDS、50mMのTris.Cl_{pH=8.1}、1mM EDTAの水溶液)に溶解した。分泌タンパク質の解析の場合は100℃・3分、膜タンパク質の場合は30分間の継続的攪拌に続く37℃・5分間の熱処理によりタンパク質をSDSで可溶化し、抗体沈殿反応に供した。

4-8:抗体沈殿反応

4-7でSDSに可溶化したサンプル30mlに対し、1mlのルブロール緩衝液(0.1%の非イオン性界面活性剤Lubrol-PX、0.1mMのEDTA、0.15MのNaCl、50mMのTris.Cl_{pH=8.1}水溶液)を加え、微量遠心器で4℃、10分間遠心分離して不溶成分を沈殿させ除去した。この上清に解析の対象となるタンパク質に対する抗体を過剰量加え、4℃にて6時間以上静置することによってタンパク質が抗体に結合した複合体を形成させた。次にプロテインA-セファロース(アガロース担体に、黄色ブドウ状球菌のプロテインAを結合したもの。免疫グロブリンGと特異的に結合する。Pharmacia)懸濁液20ml加え、4℃で1時間以上攪拌することによりこの複合体を回収した。プロテインA-セファロースをルブロール緩衝液、続いて10mMのTris.Cl_{pH=8.1}に懸濁・再遠心を行うことによって洗浄し、SDSサンプル緩衝液(62.5mMのTris.Cl、2%のSDS、5%[v/v]2-メルカプトエタノール、10%[v/v]グリセロール、微量ブROMフェノールブルーの水溶液)30mlとプロテインA-セファロースを混合することにより複合体を解離させタンパク質を可溶化した。分泌タンパク質の場合は100℃・3分、膜タンパク質は30分間の継続的攪拌に続く37℃・5分間の熱処理後、プロテインA-セファロースを遠心分離した上清をSDS-PAGEのサンプルとした。なお、SecYとアルカリ性フォスファターゼ(PhoA)との融合タンパク質を解析する場合は、ルブロール緩衝液の代わりにTriton緩衝液(0.1%のTritonX-100、0.1mMのEDTA、0.15MのNaCl、50mMのTris.Cl_{pH=8.1}水溶液)を用いた。

なお、本研究に用いた抗SecY抗体(N末端に対するもの)はDr. W. Wicknerより、抗SecE抗体は

Dr. S. Mizushima より、抗OmpA抗体はDr. Y. Anrakuよりそれぞれご供与いただいた。また抗PhoA-抗体は5'-3'-Inc. より購入したものである。

4-9: SDS-PAGE

本研究に用いたタンパク質泳動用のゲルは(A)10% Leamligel(B) 改変型15%ゲル^[100](C) 改変型19.6%ゲル^[98]の3種である。各ゲルの組成は以下に示すが、(A)は分泌タンパク質解析に、(B)はSecY-の解析に、(C)は抗SecY抗体によるSecY-SecEの複合体解析の際にそれぞれ用いた。

(A): 10% Acrylamide, 0.27% N,N'-methylenebisacrylamide, 375mM Tris.Cl_{pH=8.8}, 0.1% SDS

(B): 15% Acrylamide, 0.12% N,N'-methylenebisacrylamide, 250mM Tris.Cl_{pH=8.8}, 10mM NaCl, 0.1% SDS

(C): 19.6% Acrylamide, 0.077% N,N'-methylenebisacrylamide, 333mM Tris.Cl_{pH=8.7}, 4mM NaCl, 0.1% SDS, 6M Urea

スタッキングゲル: 5% Acrylamide, 0.13% N,N'-methylenebisacrylamide, 125mM Tris.Cl_{pH=6.8}, 0.1% SDS

なお、ゲルの重合は0.05% 過硫酸アンモニウム、0.05% N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミンの添加によって開始した。

4-10: 免疫ブロッティング

細胞をM9培地にて培養し、抗体沈殿実験時と同様にSDS-Tris-EDTA溶液にタンパク質を溶解させた。タンパク質濃度はマイクロBCAプロテインアッセイキットにより定量した。各レーンに等量のタンパク質が含まれるように調整、SDS-PAGEで分離した後、ゲル中のタンパク質をZ-Probe(Bio-Rad) ナイロンメンブレンフィルター上に電気泳動的に転写した。フィルターを42℃ 2時間、Blotto-(5% スキムミルクを含むPBSバッファー; 0.14M NaCl, 2.7mM KCl, 4.3mM Na₂HPO₄, 1.5mM KH₂PO₄) 中でブロッキングをした後、検出するタンパク質に対する抗血清(約1/1000希釈)を加え室温で1時間抗原-抗体反応を行わせた。0.1%(v/v)のPBS-Tween (0.1%(v/v)のTween20を含む上記PBS バッファー、スキムミルクは含まない) で洗浄し、PBS-Tween中に西洋ワサビペルオキシダーゼで標識したヤギの抗ウサギIgG(Bio-Rad)を1/5000希釈し室温で1時間反応させた。PBS-Tweenによる洗浄後、ECL ウェスタンブロッティング検出キットを用い(ルミノールと共役させたペルオキシダーゼの発光基質を含む)、X線フィルム上で露光することによって目的のタンパク質のバンドを検出した。

4-11: 抗SecY抗体による免疫共沈殿実験=SecY-SecEの複合体検出

Driessen^[103]及びBrundage^[77]の方法に従った。実験に用いる菌株をM9液体培地中(株の保持するプラスミドの薬剤耐性マーカーに応じてその薬剤を適宜加える)でK.U.=40まで生育させ(通常2~5mlの培養液を用いた)、40 mCi/mlの^[35]Sメチオニンを加えて細胞を放射性標識した。細胞を遠心分離し回収後、0.5mlの緩衝液C(20%グリセロール、50mM HEPES/KOH pH=7.0、50mM KCl、1mM DTTの水溶液)に再懸濁した。食塩を添加した氷浴上で、マイクロプローブを装着したソニケーター(HEATSYSTEMS & ULTRASONICS Inc.)により、各40秒間の間隔を置いた20秒間、5回の操作により細胞を超音波破碎する。HITACHI卓上超遠心器用ローター RP100AT を用い6000回転、5分間の遠心で未破碎細胞を沈殿・分離した後、尿素を含んだ緩衝液Cを、最終濃度が6Mとなるように加え、0℃で20分保温する。次に同じローターを用い、100000回転、25分間遠心することにより膜画分を回収する。回収した膜は0.5mlの緩衝液Cに再懸濁する。この膜懸濁液を、16.5mMのTris.Cl_{pH=7.9}、5mMのp-アミノベンズアミジン塩酸塩(セリンプロテアーゼ阻害剤)、1.25%の1-O-n-オクチル-β-D-グルコピラノシド、3.25mg/mlの大腸菌リン脂質(Avanti polar lipid Co.)及び25%のグリセロールをそれぞれ含む緩衝液中に最大半量(体積比)となるように加え、0℃で30分保温することにより可溶化させる。不可溶化画分を、HITACHI卓上超遠心器用ローター RP120ATを用いて12000回転、20分間の遠心によって沈殿・分離させ上清の可溶化画分を回収する。可溶化画分体積1に対して1.5倍量のIP緩衝液(50mMのTris.Cl_{pH=8.1}、150mMのNaCl、1.25%の1-O-n-オクチル-β-D-グルコピラノシド、1.5mg/mlの大腸菌リン脂質及び40%のグリセロールの水溶液)を加え、抗SecY抗体(標識の際の培養液1mlに対して10mlの抗血清を用いた)を添加し0℃において2時間保温した後、15mlのプロテインA-

セファロース (10mM Tris.Cl_{pH=8.1} への半体積懸濁液) を添加し、4℃で2時間保温し抗SecY抗体に結合したタンパク質を回収した。この際反応の抗SecY血清に対する特異性を確認するために各サンプルにこの抗血清作製に用いた抗原ペプチドを添加したものも用意した (1mg/mlに調製したペプチド1mlに対して抗SecY血清1mlの割合で用いた)。SDSサンプルバッファー () でタンパク質を溶出した後SDS-PAGEで分離・解析した。

4-12: Tn $phoA$ によるプラスミドへのランダムトランスポジション^[82,83]

X4リンカー挿入変異を持つpKY259(pKY259-X4)を、F因子上にTn $phoA$ (アルカリ性フォスファターゼ遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子を保持するトランスポゾン) を持つCC202株に導入した。20mg/mlのCmを含むLB寒天培地上で得られた形質導入株を100mlのLB液体培地に懸濁後、20mg/mlのCm、250mg/mlのカナマイシン(Km)及び40mg/mlの5-ブromo-4-クロロ-3-インドリルリン酸(XP)を含むLB寒天培地上に塗布する。この操作で得られる高濃度カナマイシン耐性形質転換株をスクリーンすることにより、細胞内に複数コピーを持つプラスミド上にトランスポジションが起こったものを分離することができる。2日間37℃で保温した後、青色を呈するコロニー (そのほとんどはSecYのペリプラズム領域にPhoAが付加している融合タンパク質を発現しているもの) を選び、プラスミドを分離・制限酵素地図の作製や塩基配列決定による $phoA$ 融合領域の解析等を行う。

4-13: PhoAのフォールディングアッセイ^[85]

Akiyamaらの方法に従った。pYXP268及びpYXP299を保持するBB030株を5分間バルスラベルして回収後、培養液と等量の緩衝液 (20%の蔗糖、30mM Tris.Cl_{pH=8.1} を含む) に懸濁し、さらに1/10量のリゾチーム溶液 (0.1M EDTAに溶解させ10mg/mlに調製したもの) を加え、0℃で30分間保温することによって細胞の外膜を破壊してスフェロプラスト化する。1%のTriton-X100で膜構造を可溶化した後50mg/mlのトリプシンを添加 (あるいは不添加) し、0℃で30分間保温する。TLCK及びPMSFを各1mM添加し、0℃・10分の保温することによりトリプシン消化反応を停止させる (これ以降の操作では全てTLCK及びPMSFを添加しておく)。続いて抗PhoA抗体による抗体沈殿を行いSDS-PAGEによってタンパク質の分離・解析を行う。

§ 第5章：参考文献

- 1: Blobel, G. and Dobberstein, B. (1975) *J. Cell Biol.* **67**, 835-851.
- 2: Walter, P. and Blobel, G. (1982) *Nature* **299**, 691-698.
- 3: Walter, P. and Blobel, G. (1981) *J. Cell Biol.* **91**, 557-561.
- 4: Siegel, V. and Walter, P. (1985) *J. Cell Biol.* **100**, 1913-1921.
- 5: Wolin, S.L. and Walter, P. (1989) *J. Cell Biol.* **109**, 2617-2622.
- 6: Gilmore, R., Walter, P. and Blobel, G. (1982) *J. Cell Biol.* **95**, 470-477.
- 7: Mayer, D.I., Krause, E. and Dobberstein, B. (1982) *Nature* **297**, 117-120.
- 8: Siegel, V. and Walter, P. (1988) *Cell* **52**, 39-49.
- 9: Connolly, T. and Gilmore, R. (1989) *Cell* **57**, 599-610.
- 10: Rapiejko, P.J. and Gilmore, R. (1992) *J. Cell Biol.* **117**, 493-503.
- 11: Stirling, C.J., Rothblatt, J., Hosobuchi, M., Deshaies, R. and Schekman, R. (1992) *Mol. Biol. Cell* **3**, 129-142.
- 12: Rothblatt, J.A., Deshaies, R.J., Sanders, S.L., Daum, G. and Schekman, R. (1989) *J. Cell Biol.* **72**, 61-68.
- 13: Vogel, J.P., and Rose, M.D. (1990) *J. Cell Biol.* **110**, 1885-1895.
- 14: Nguyen, T., Law, K. and Williams, D. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 1565-1569.
- 15: Pfanner, N. and Neupert, W. (1990) *Annu. Rev. Biochem.* **59**, 331-353.
- 16: Glick, B. and Schatz, G. (1991) *Ann. Rev. Genet.* **25**, 21-44.
- 17: Kiebler, M., Pfaller, R., Söllner, T., Griffiths, G., Horstmann, H., Pfanner, N. and Neupert, W. (1990) *Nature* **348**, 610-616.
- 18: Söllner, T., Griffiths, G., Pfaller, R. and Neupert, W. (1989) *Cell* **59**, 1061-1070.
- 19: Steger, H., Söllner, T., Kiebler, M., Dietmeier, K. A., Pfaller, R., Trülzsch, K., Tropschug, M., Neupert, W. and Pfanner, N. (1990) *J. Cell Biol.* **111**, 2353-2363.
- 20: Kiebler, M., Keil, P., Schneider, H., van der Klei, I., Pfanner, N. and Neupert, W. (1993) *Cell* **74**, 483-492.
- 21: Deshaies, R.J., Koch, B.D., Werner-Washburne, M. and Craig, E.A. (1988) *Nature* **332**, 800-805.
- 22: Kang, P.-J., Ostermann, J., Shilling, J., Neupert, W., Craig, E.A. and Pfanner, N. (1990) *Nature* **348**, 137-143.
- 23: Koll, H., Guiard, B., Rassow, J., Ostermann, J., Horwich, A. L., Neupert, W. and Hartl, F. U. (1992) *Cell* **63**, 1163-1175.
- 24: Ostermann, J., Horwich, A.L., Neupert, W. and Hartl, F.U. (1989) *Nature* **341**, 125-130.
- 25: Manning-Krieg, U., Scherer, P. E. and Schatz, G. (1991) *EMBO J.* **10**, 3273-3280.
- 26: Ito, K., Mandel, G. and Wickner, W. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 1199-1203.
- 27: Crowles, I., Gamon, K. and Henning, U. (1981) *Eur. J. Biochem.* **113**, 375-380.
- 28: Koshland, D. and Botstein, D. (1982) *Cell* **30**, 893-902.
- 29: Randall, L.L. (1983) *Cell* **33**, 231-240.
- 30: Zwizinski, C. and Wickner, W. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**, 7973-7977.
- 31: Gorlich, D., Prehn, S., Hartmann, E., Kalies, K.-U. and Rapoport, T.A. (1992) *Cell* **71**, 489-503.
- 32: Schatz, P.J. and Beckwith, J. (1990) *Annu. Rev. Genet.* **24**, 215-248.
- 33: Wickner, W., Driessen, A.J.M. and Hartl, F. (1991) *Annu. Rev. Biochem.* **60**, 101-124.
- 34: Oliver, D.B. and Beckwith, J. (1981) *Cell* **25**, 765-772.
- 35: Gardel, C., Benson, S., Hunt, J., Michaelis, S. and Beckwith, J. (1987) *J. Bacteriol.* **169**, 1286-1290.
- 36: Ito, K., Wittekind, M., Nomura, M., Shiba, K., Yura, T., Miura, A. and Nashimoto, H. (1983) *Cell* **32**, 789-797.
- 37: Riggs, P.D., Derman, A.I. and Beckwith, J. (1988) *Genetics* **118**, 571-579.
- 38: Kumamoto, C.A. and Beckwith, J. (1983) *J. Bacteriol.* **154**, 254-260.
- 39: Shiba, K., Ito, K., Yura, T. and Cerretti, D.P. (1984) *EMBO J.* **3**, 631-635.
- 40: Ito, K., Hirota, Y. and Akiyama, Y. (1989) *J. Bacteriol.* **171**, 1742-1743.
- 41: Schatz, P.J., Riggs, P.D., Jacq, A., Fath, M.J. and Beckwith, J. (1989) *Genes Dev.* **3**, 1035-1044.
- 42: Baba, T., Jacq, A., Brickman, E., Beckwith, J., Taura, T., Ueguchi, C., Akiyama, Y. and Ito, K. (1990) *J. Bacteriol.* **172**, 70-7010.

- 43: Taura, T., Baba, T., Akiyama, Y. and Ito, K. *J. Bacteriol.* **175**, in press.
- 44: Bankaitis, v.A. and Bassford-Jr, P.J. (1985) *J. Bacteriol.* **161**, 1169-1178.
- 45: Ryan, J.P. and Bassford-Jr, P.J. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 14832-14837.
- 46: Emr, S.D., Hanley-Way, S. and Silhavy, T.J. (1981) *Cell* **23**, 79-88.
- 47: Stader, J., Gansheroff, L.J. and Silhavy, T.J. (1989) *Genes Dev.* **3**, 1045-1052.
- 48: Randall, L.L. and Hardy, S.J.S. (1986) *Cell* **46**, 921-928.
- 49: Collier, D.N., Bankaitis, V.A., Weiss, J.B. and Bassford-Jr, P.J. (1988) *Cell* **53**, 273-283.
- 50: Bochkareva, E.S., Lissin, N.M. and Girshovich, A.S. (1988) *Nature* **336**, 254-257.
- 51: Kusukawa, N., Yura, T., Ueguchi, C., Akiyama, Y. and Ito, K. (1989) *EMBO J.* **8**, 3517-3521.
- 52: Hardy, S.J.S. and Randall, L.L. (1991) *Science* **251**, 439-443.
- 53: Hartl, F., Lecker, S., Schiebel, E., Hendrick, J.P. and Wickner, W. (1990) *Cell* **63**, 269-279.
- 54: Akita, M., Shinkai, A., Matsuyama, S. and Mizushima, S. (1991) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **174**, 211-216.
- 55: Schmidt, M.G., Rollo, E.E., Grodberg, J. and Oliver, D.B. (1988) *J. Bacteriol.* **170**, 3404-3414.
- 56: Oliver, D.B., Cabelli, R.J., Dolan, K.M. and Jarosik, G.P. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 8227-8231.
- 57: Dolan, K.M. and Oliver, D.B. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 23329-23333.
- 58: Joly, J.C. and Wickner, W. (1993) *EMBO J.* **12**, 255-263.
- 59: Lill, R., Cunningham, K., Brundage, L.A., Ito, K., Oliver, D. and Wickner, W. (1989) *EMBO J.* **8**, 961-966.
- 60: Matsuyama, S., Kimura, E. and Mizushima, S. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 8760-8765.
- 61: Schiebel, E., Driessen, A.J.M. and Hartl, F.U. (1991) *Cell* **64**, 927-939.
- 62: Lill, R., Dowhan, W. and Wickner, W. (1990) *Cell* **60**, 271-280.
- 63: Ulbrandt, N.D., London, E. and Oliver, D.B. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 15184-15192.
- 64: Akiyama, Y. and Ito, K. (1987) *EMBO J.* **6**, 3465-3470.
- 65: Shiba, K., Ito, K. and Yura, T. (1984) *J. Bacteriol.* **160**, 696-701.
- 66: Shimoike, T., Akiyama, Y., Baba, T., Taura, T. and Ito, K. (1992) *Mol. Microbiol.* **6**, 1205-1210.
- 67: Taura, T., Akiyama, Y. and Ito, K. *Mol. Gen. Genet.* in press.
- 68: Nishiyama, K., Kaburayama, Y., Akimaru, J., Matsuyama, S., Tokuda, H. and Mizushima, S. (1991) *Biochem. Biophys. Acta* **1065**, 89-97.
- 69: Brundage, L., Hendrick, J.P., Schiebel, E., Driessen, A.J.M. and Wickner, W. (1990) *Cell* **62**, 649-657.
- 70: Akimaru, J., Matsuyama, S., Tokuda, H. and Mizushima, S. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 6545-6549.
- 71: Schatz, P.J., Riggs, P.D., Jacq, A., Fath, M.J. and Beckwith, J. (1989) *Genes Dev.* **3**, 1035-1044.
- 72: Gardel, C., Johnson, K., Jacq, A. and Beckwith, J. (1990) *EMBO J.* **9**, 3209-3216.
- 73: Reuter, K., Slany, R., Ullrich, F. and Kersten, H. (1991) *J. Bacteriol.* **173**, 2256-2264.
- 74: Matsuyama, S., Fujita, Y. and Mizushima, S. (1993) *EMBO J.* **12**, 265-270.
- 75: Akiyama, Y. and Ito, K. (1986) *Eur. J. Biochem.* **159**, 263-266.
- 76: Matsuyama, S., Akimaru, J. and Mizushima, S. (1990) *FEBS Lett.* **269**, 96-100.
- 77: Brundage, L., Fimmel, C.J., Mizushima, S. and Wickner, W. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 4166-4170.
- 78: Bieker, K.L. and Silhavy, T.J. (1990) *Cell* **61**, 833-842.
- 79: Osborne, R. S. and Silhavy, T.J. (1993) *EMBO J.* **12**, 3391-3398.
- 80: Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, N. Y., Cold Spring Harbor Laboratory.
- 81: Rapoport (1985) *FEBS* **187** 1-10
- 82: Manoel, C. and Beckwith, J. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 8129-8133.
- 83: Manoel, C. and Beckwith, J. (1986) *Science*, **233**, 1403-1408
- 84: Calamia, J. and Manoel, C. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 4937-4941.
- 85: Akiyama, Y. and Ito, K. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 437-442.
- 86: Shimoike, T. *et al.* unpublished result
- 87: Taura, T. and Fujita, M. unpublished result
- 88: Shiba, K., Ito, K., Yura, T. and Cerretti, D.P. (1984) *EMBO J.* **3**, 631-635.
- 89: Schatz, P., Bieker, K. L., Ottemann, K.M., Silhavy, T.J. and Beckwith, J. (1991) *EMBO J.* **10**, 1749-1757.
- 90: Nishiyama, K., Mizushima, S. and Tokuda, H. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 7170-7176.
- 91: Jeong, S., Yoshikawa, H. and Takahashi, H. (1993) *Mol. Microbiol.* **10**, 133-142

- 92: Nishiyama, K., Mizushima, S. and Tokuda, H. (1993) *EMBO J.* **12**, 3409-3415.
- 93: Silhavy, T.J., Berman, M.L. and Enquist, L.W. (1984) *Experiments with Gene Fusions*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- 94: Akiyama, Y. and Ito, K. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **167**, 711-715.
- 95: Vieira, J. and Messing, J. (1982) *Gene* **19**, 259-268
- 96: Ueguchi, C. and Ito, K. (1992) *J. Bacteriol.* **174**, 1454-1461.
- 97: Kunkel, T. A., Roberts, J. D. and Zakour, R. A. (1987) *Methods Enzymol.* **154**, 367-382
- 98: Ito, K., Bassford, Jr. P. and Beckwith, J. (1981) *Cell* **24**, 707-717
- 99: Sanger, F. (1981) *Science* **214**, 1205-1210.
- 100: Ito, K. (1984) *Mol. Gen. Genet.* **197**, 204-208.
- 101: Miller, J.H. (1972) *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York
- 102: Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. (1990) *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons,
- 103: Driessen, A., Brandage, L., Hendrick, J. P., Schiebel, E. and Wickner, W. (1991) *Methods Cell Biol.* **34** 147-165
- 104: Oliver, D. B., and Beckwith, J (1982) *Cell* **30**, 311-319
- 105: Cerretti, D.P., Dean, D., Davis, G.R., Bedwell, D.M. and Nomura, M. (1983) *Nuc. Acids Res.* **11**, 2599-2616.
- 106: Murphy, C. K., and Beckwith, J (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* in press

§ 謝辞

本研究を進めるにあたり、以下の方々に大変お世話になりました。ここに感謝の意を表したいと思います。

伊藤維昭先生は、研究者としては全く未熟である私を終始ご指導してくださいました。先生から御教授いただいた研究者としての精神や、研究を遂行する上での態度というものは私の生涯の糧となるものです。また、本研究で取り上げたテーマに関してなされた議論も大変印象深いものでした。本当にありがとうございました。

秋山芳展博士、吉久徹博士、田浦徹也博士には、常に大変有益な御助言、御指導を賜りました。先生方の博識と研究に対する情熱は、さほど歳が変わらぬ私には良い刺激となりました。また、貴重な実験データも本論文で取り上げ、考察することもできました。

構造形成学分野の全ての皆様にも大変お世話になりました。特に望月清子さん、片岡順子さんには実験補助及び事務的な場面で広くお世話になりました。また、下池貴志さん、岸上哲士さん、藤田末右紀さん、白井良憲さん、曾根道夫さん、木原章雄さんには日々の実験をお手伝いいただきました。また、Kurt Cannonさんには主論文の英文をチェックしていただきました。これらのことのために貴重な時間を割いてくださったことに厚くお礼を申し上げます。また、ウイルス研究所の皆さんにも大変お世話になったことを書き加えさせていただきたいと思います。

本研究で用いました *secY* 合成プライマーはヤクルト中央研究所の左古知行博士から、抗SecE抗体は東京薬科大学の水島昭二博士から、抗SecY抗体はW. Wickner博士から、抗OmpA抗体は東京大学の安楽泰宏博士から、また *secA-lacZ* 保持株はJ. Beckwith博士からそれぞれ後供与いただきました。

皆様どうもありがとうございました